

SÉRIE A, N° 47

N° D'ORDRE :

54

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PAR

JULES WOLFF

CHEF DE LABORATOIRE ADJOINT A L'INSTITUT PASTEUR

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A LA CONNAISSANCE DE DIVERS PHÉNOMÈNES
OXYDASIQUES NATURELS ET ARTIFICIELS.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le *Nov 11* 1910 devant la Commission d'examen

President : M. BOUTY.

Examineurs { MM. G. BERTRAND.
A. FERNBACH.

LAVAL

L. BARNEOUD & C^{ie}, IMPRIMEURS

8, RUE RICORDAINE, 8

—
1910

11. 11. 18

SÉRIE A, N° 47

N° D'ORDRE :

54

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PAR

JULES WOLFF

CHEF DE LABORATOIRE ADJOINT A L'INSTITUT PASTEUR

- 1^{re} THÈSE.** — CONTRIBUTION A LA CONNAISSANCE DE DIVERS PHÉNOMÈNES
OXYDASIQUES NATURELS ET ARTIFICIELS.
- 2^e THÈSE.** — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le *11 avril* 1910 devant la Commission d'examen.

President : M. BOUTY.

Examineurs { MM. G. BERTRAND.
A. FERNBACH.

LAVAL

L. BARNÉOUD & C^{ie}, IMPRIMEURS

8, RUE RICORDAINE, 8

1910



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen..... P. APPELL, *Profess.* Mécanique rationnelle.

Doyen honoraire.... G. DARBOUX. — Géométrie supérieure.

Profess. honoraires. { L. TROOST.
Ch WOLF
J. RIBAN.

<i>Professeurs</i>	{	LIPPMANN	Physique
		BOUTY.....	Physique.
		BOUSSINESQ	Phys.mathém. et calcul des probabilités.
		PICARD	Analyse supér. et algèbre supérieure.
		H. POINCARÉ.....	Astronomie mathém. et mécan. céleste.
		Y. DELAGE	Zoologie, anatomie, physiologie compar.
		G. BONNIER	Botanique.
		DASTRE	Physiologie
		KOENIGS.....	Mécanique physique et expérimentale.
		VÉLAIN.....	Géographie physique.
		GOURSAT.....	Calcul différentiel et calcul intégral.
		CHATIN.....	Histologie.
		HALLER.....	Chimie organique.
		JOANNIS.....	Chimie (Enseignement P. C. N.).
		JANET.....	Physique — —
		WALLERANT.....	Minéralogie.
		ANDOYER.....	Astronomie physique.
		PAINLEVÉ.....	Mathématiques générales.
		HAUG	Géologie.
		TANNERY.....	Calcul différentiel et calcul intégral.
		RAFFY	Application de l'analyse à la géométrie.
		HOUSSAY.....	Zoologie.
		H. LE CHATELIER.	Chimie.
		G. BERTRAND.. ..	Chimie biologique.
M ^{me} P. CURIE.....	Physique générale.		
CAULLERY	Zoologie (Évolution des êtres organisés)		
C. CHABRIÉ.....	Chimie appliquée.		
G. URBAIN.....	Chimie		
BOREL	Théorie des fonctions.		
MARCHIS.....	Aviation.		
N.....	Physique.		
N.....	Zoologie, anatomie, physiol. comparée.		

<i>Professeurs-adjoints.</i>	{	PUISEUX	Physique céleste.
		LEDUC.....	Physique.
		MATRUHOT.....	Botanique.
		MICHEL	Minéralogie.
		G. PRUVOT	Anatomie comparée.
		HEROUARD.....	Zoologie.
		LÉON BERTRAND..	Géologie.
		RÉMY PERRIER....	Zoologie(Enseignement P. C. N.).
		JEAN PERRIN.....	Chimie physique.
		MOLLIARD.....	Physiologie végétale.
COTTON	Physique.		

Secrétaire A. GUILLET.

A MONSIEUR LE DOCTEUR ÉMILE ROUX

MEMBRE DE L'INSTITUT ET DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

Hommage respectueux.

A MONSIEUR AUGUSTE FERNBACH

MAÎTRE DE CONFÉRENCES A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

PROFESSEUR A L'INSTITUT PASTEUR

Hommage amical.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INTRODUCTION

Aucun biologiste ne peut se montrer indifférent à toute contribution ayant trait à l'étude de la constitution des diastases, ces puissants agents d'assimilation ou de destruction dont le rôle est si intimement lié à l'existence de tous les êtres vivants. Ces diastases, produits de sécrétion de toute cellule vivante sont les intermédiaires nécessaires, indispensables entre cette dernière et le milieu où elle évolue; elles sont comme le trait d'union entre la matière organisée et la matière inerte en permettant à celle-ci d'être assimilée par celle-là.

Partout où la vie se manifeste on rencontre des diastases. Ce qui met bien en évidence le rôle prépondérant de ces substances dans les phénomènes vitaux, c'est le fait que les organismes les plus vivaces et les organes les plus nécessaires à la vie sont précisément ceux qui sécrètent les diastases les plus puissantes. C'est le monde des infiniment petits qui nous offre à ce point de vue l'exemple le plus frappant : en effet, les générations s'y succèdent avec une rapidité extrême et l'élaboration des diastases s'y fait avec une grande activité. On dirait que l'intensité de la vie de l'être ou de ses organes est liée à l'intensité des sécrétions diastasiques. Ainsi, nous voyons leur puissance se développer et s'exalter dans l'estomac au moment de la digestion, et dans les graines (principalement les céréales) au moment de la germination; les diastases amylolytiques acquièrent, en effet, une énergie nouvelle dès l'instant où la vie de l'embryon commence à se manifester.

Parmi les champignons qui croissent, se développent et fructifient avec une si étonnante rapidité, on trouve chez certaines espèces (bolets, *Russula delica*, etc.) des diastases oxydantes d'une très grande puissance (laccase, tyrosinase) qui ont été mises en évidence et étudiées par MM. G. BERTRAND (1) et BOURQUELOT mais ce sont les champignons microscopiques qui nous offrent l'exemple le plus typique d'une prodigieuse intensité de vie coïncidant avec l'apparition des diastases les plus diverses et les plus actives : tel l'*Aspergillus Niger*, cultivé sur liquide RAULIN ; telles les levures avec leur production de sucrase, de maltase, de zymase, etc., et parmi les autres micro-organismes, tous ces microbes pathogènes qui se reproduisent avec une rapidité foudroyante, semant la mort par leur besoin de vie, grâce aux toxines, ces sécrétions diastasiques vénéneuses qui, à des doses infinitésimales, sont des poisons de la cellule vivante. Les diastases et les toxines ont, en effet, de nombreuses propriétés communes (2) qui les font considérer par quelques auteurs comme des espèces chimiques de même nature. Toutes deux possèdent la propriété remarquable, lorsqu'on les injecte à un animal en prenant les précautions nécessaires, de provoquer dans l'organisme de cet animal l'apparition d'anticorps. Ces anticorps, qui constituent le principe curatif des sérums ont la propriété de neutraliser l'action des toxines ou des diastases *in vitro* ou *in vivo*. Citons à ce propos les beaux travaux du docteur ROUX, de BEHRING, de YERSIN, auxquels nous devons les sérums antidiphthérique, antitétanique, antipesteux. D'autre part, le docteur GESSARD a réussi à préparer un grand nombre d'anticorps avec des diastases d'origine animale et végétale.

1. C'est M. G. BERTRAND qui a découvert la tyrosinase dans le suc de Russule. Le même auteur a décelé la présence d'une tyrosinase dans le son et il explique la coloration du pain de son ou du pain bis par l'action de cette oxydase sur la tyrosine.

2. MM. ROUX et YERSIN sont les premiers qui ont montré les analogies qui peuvent exister entre les diastases et les toxines. (*Ann. de l'Institut Pasteur*, t. II, 1891, p. 629).

Ces notions qui nous sont aujourd'hui familières ne nous ont été révélées que par une longue série de travaux et il serait profondément injuste, dans une étude sur les diastases, de ne pas adresser un hommage reconnaissant aux morts illustres et aux savants actuels auxquels nous devons leur découverte, ainsi que les progrès qui en sont résultés dans la science.

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE PREMIER

GÉNÉRALITÉS SUR LES DIASTASES — LEUR DÉCOUVERTE

Les phénomènes diastasiques déjà entrevus par RÉAUMUR (2), SPALLANZANI (3), KIRCHHOF (4), DUBRUNFAUT (5), n'ont été véritablement dégagés de l'obscurité qui les entourait que par les travaux de PAYEN et PERSOZ (6). Laissons un instant la parole à E. DUCLAUX (7) et voyons le jugement qu'avec son esprit impartial et pénétrant il porte sur leur découverte : « PAYEN et PERSOZ avaient presque tout vu de ce qui constitue encore aujourd'hui l'histoire de leur diastase (l'amylase du malt) et même l'histoire de presque toutes les diastases que caractérisent leur solubilité dans l'eau, leur insolubilité dans l'alcool concentré et surtout la disproportion entre la quantité de matière agissante et la quantité d'effet produit ».

A peine PAYEN (8) a-t-il établi la spécificité de la diastase de l'orge (1834), qui n'agit que sur l'amidon, que LIEBIG et WOEHLER découvrent l'émulsine (9) (1837) contenue dans les amandes. Celle-ci possède la propriété de dédoubler plusieurs glucosides : l'amygdaline, la salicine, l'arbutine. Il existe donc des cas où il faut donner une interprétation plus large à la notion de spécificité.

Opinion de Berthelot sur les ferments solubles. — BERTHE-

LOT (10), en 1860, à la suite des beaux travaux de PASTEUR sur la levure de bière parvient à isoler la sucrase sécrétée par ce végétal et montre le premier que l'être vivant n'est pas le ferment, mais que c'est lui qui l'engendre. « Les ferments solubles, dit-il, une fois produits, exercent leur action indépendamment de tout acte vital ultérieur ». Il identifie ainsi les ferments solubles avec les diastases. La découverte de la zymase, qui dédouble le sucre en alcool et acide carbonique, extraite de la levure par BUCHNER (11) en 1897 devait confirmer quelques années plus tard d'une façon éclatante la manière de voir de BERTHELOT.

Les diastases dont il vient d'être question jusqu'ici exercent une action dédoublante simple ou dédoublante avec fixation d'eau (hydrolysantes).

Les diastases oxydantes. — Les diastases oxydantes, auxquelles ce travail est exclusivement consacré dans sa partie originale, sont d'une découverte beaucoup plus récente. Néanmoins leur existence fut déjà soupçonnée et par SCHOENBEIN en 1855 et par TRAUBE en 1853, et plus tard CLAUDE BERNARD (12) exprima très nettement l'opinion que ce sont des ferments oxydants qui interviennent dans les phénomènes respiratoires.

Dès 1892, JAQUET (13) montra que sous l'influence des extraits de poumons ou de reins l'aldéhyde salicylique fournit des quantités considérables d'acide salicylique. Il vit que la substance active est insoluble dans l'alcool et qu'elle est détruite par l'ébullition. Il en conclut que le principe actif des oxydations dans le corps est une diastase. Toutefois BATELLI et M^{lle} STERN (14) montrèrent dans la suite que cette oxydation particulière est due à d'autres causes.

Découverte des oxydases. — En 1883, KIKOROKURO YOSHIDA (15), en étudiant la formation de la laque japonaise qui s'obtient avec le suc laiteux du *Rhus Vernicifera* (ou arbre à laque), en retira une substance blanche qu'il assimila à une diastase parce que, sans elle, le suc ne se laquait pas et que, en l'ajou-

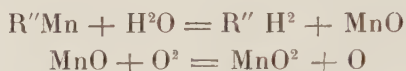
tant au suc d'où on l'avait retirée, on lui restituait ses propriétés.

Expériences de G. Bertrand. — Rôle du manganèse dans les phénomènes oxydasiques. — Reprenant ces travaux, M. G. BERTRAND (16), avec une grande sagacité, mit le premier en relief le rôle prépondérant que peut jouer un métal, le manganèse, dans le fonctionnement des oxydases. Après avoir montré que l'oxydase de l'arbre à laque qu'il baptisa du nom de laccase, est une diastase qui fixe l'oxygène atmosphérique sur certains composés de la série aromatique, dont les plus sensibles contiennent dans leur noyau au moins deux groupements OH ou AzH^2 (situés les uns par rapport aux autres, soit en position ortho, soit en position para), il prouva que l'on trouve invariablement du manganèse dans ses cendres (17). En étudiant les sels de manganèse (18) et en recommençant avec eux les mêmes expériences qu'avec la laccase, il a vu que les sels de ce métal fixent l'oxygène de l'air sur l'hydroquinone, le pyrogallol, le paramidophénol et il a pu reproduire en se servant de l'hydroquinone comme substance oxydable, des oxydations analogues à celle que l'on obtient avec la laccase. M. G. BERTRAND continuant ses recherches sur le même sujet trouva que la diastase extraite de certains végétaux, comme la luzerne est inactive ; ce n'est que par l'addition de traces d'un sel de manganèse à l'extrait inactif qu'il a pu lui communiquer une grande activité.

Hypothèses de G. Bertrand sur le mécanisme des actions diastasiques en général et oxydasiques en particulier. — Ce fait remarquable, rapproché de l'action de la pectase qui ne peut fonctionner qu'en présence d'un sel de calcium, de la pepsine qui a besoin d'un acide pour exercer ses propriétés digestives, suggère à M. BERTRAND les réflexions suivantes : « Désor-
« mais, il faudra tenir compte dans l'étude des ferments solu-
« bles, non seulement de la substance organique et très
« altérable, à laquelle nous attachions jusqu'ici toute l'idée
« du ferment soluble, mais encore de celles qu'on pourrait
« appeler coferment, ici minérales, là peut-être organiques,

« qui forment avec la première le système véritablement « actif » (19).

Pour expliquer le fonctionnement de la laccase M. G. BERTRAND, se basant sur ses observations relatives aux sels de manganèse, a imaginé une théorie fort ingénieuse ; il admet que l'oxydase est une combinaison instable d'un acide faible avec le manganèse. Cette combinaison, en présence de l'eau, abandonnerait en s'hydrolysant du protoxyde de manganèse, lequel, au contact de l'air, se transformerait en bioxyde et en même temps mettrait en liberté de l'oxygène atomique très actif :



Enfin, le bioxyde de manganèse, en se combinant de nouveau avec l'acide faible pour former le sel primitif, mettrait encore un atome d'oxygène actif en liberté :



puis, les choses recommenceraient comme plus haut. C'est grâce à ce mécanisme se poursuivant indéfiniment que des traces de manganèse seraient capables d'oxyder des quantités considérables de substance.

Influence des métaux et des sels dans les phénomènes oxydatives. — JOB (20) a signalé (5 janvier 1903) l'activité de quelques sels de terres rares comme excitateurs d'oxydation vis-à-vis de l'hydroquinone ; de plus, cet auteur a montré que l'oxydation spontanée du carbonate céréux potassique et que les oxydations déterminées par son contact présentent un tel caractère de netteté qu'on y trouve un exemple type pour l'étude et l'illustration de ce genre de phénomènes (21). De plus, JOB a vu que l'acétate céréux se comporte vis-à-vis de l'hydroquinone comme l'acétate de manganèse (22).

FOUARD a observé une absorption lente de l'air par l'hydroquinone sous l'influence ionisante des chlorures alcalins et alcalino-terreux. Les plus actifs de ces chlorures sont ceux de sodium, de manganèse, de calcium, de potassium (23).

D'autre part, M. FOUARD a mesuré au bout de huit jours l'oxygène absorbé par l'hydroquinone sous l'influence de composés halogénés des terres rares (24).

On constate une absorption de :

7 cc.	5	pour	SaCl^3
6 cc.	5	»	ThCl^4
5 cc.	8	»	CeCl^3
1 cc.	8	»	NaCl

Ces oxydations se distinguent par leur lenteur des phénomènes oxydasiques rapides signalés plus haut.

En 1904, M. TRILLAT (25) en incorporant des traces de chlorure manganéux à une solution à 3 p. 100 d'albumine d'œuf faiblement alcalinisée a obtenu une combinaison colloïdale de manganèse possédant à un très haut degré la propriété de fixer l'oxygène de l'air sur le pyrogallol avec formation d'abondants cristaux de purpurogalline. M. TRILLAT a pu démontrer, par des essais comparatifs, que, s'il est vrai que l'alcali fixe déjà par lui-même une certaine quantité d'oxygène sur le pyrogallol, son rôle est surtout d'activer le manganèse. L'alcali amorce d'abord la réaction, puis sert d'intermédiaire entre l'oxygène de l'air et le manganèse.

Généralités sur les peroxydiastases

La connaissance des oxydases qui peuvent fixer directement l'oxygène atmosphérique sur certains composés de la série aromatique a singulièrement facilité la découverte et l'étude des peroxydases ou peroxydiastases ; celles-ci ne fixent pas directement l'oxygène libre ou moléculaire, mais l'empruntent aux peroxydes et, pour les caractériser, il faut avoir recours à l'eau oxygénée ou à d'autres peroxydes.

Pour mettre en évidence la présence des peroxydiastases, on a recours aux réactifs qui servent à caractériser les oxydases du type de la laccase, mais en y ajoutant en plus H^2O^2

(Ces réactifs ont été indiqués pour la première fois par G. BERTRAND au cours de ses études sur la laccase).

C'est SCHÖNBEIN (26) qui observa le premier que les extraits et les tissus d'origine animale et végétale possèdent la propriété de décomposer rapidement le peroxyde d'hydrogène avec mise en liberté d'oxygène et, en outre, d'activer le peroxyde, de l'inciter à produire des oxydations que, seul, il n'est pas capable de produire.

SCHÖNBEIN pensait toutefois que ces propriétés appartenaient à une seule et même diastase (On a montré depuis que la faculté de décomposer l'eau oxygénée doit être attribuée à une diastase spéciale : la catalase).

En observateur de génie qu'il fut, le savant balois remarqua l'analogie de ce mode d'oxydation avec celui que provoque le sulfate de fer en présence d'eau oxygénée.

Confusion qui a régné entre la peroxydiastase et la catalase. Mise au point de la question par Læw. — C'est JACOBSON (27) qui établit nettement le fait que le principe qui active le peroxyde d'hydrogène ne doit pas être confondu avec les autres ferments. SPITZER (28) qui chercha à mesurer le pouvoir oxydant des tissus animaux confondit, lui aussi, la catalase avec la peroxydase, mais il fut frappé par ce fait que l'activité oxydante des divers sucs de l'organisme est en rapport avec leur richesse en fer. C'est Læw (29) qui démontra d'une manière irréfutable que la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène en mettant en liberté l'oxygène moléculaire, appartient à un enzyme spécial très répandu dans les tissus animaux et végétaux, auquel il donna le nom de catalase. Le même auteur mit aussi en évidence la spécificité des peroxydases. C'est LINOSSIER (30) qui proposa le nom de peroxydases, mais, comme il attribuait aussi à la peroxydase la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène, on peut dire qu'il a confondu les deux actions. Quoi qu'il en soit, le nom de peroxydase a été adopté dans la littérature de tous les pays. Tout récemment, M. G. BERTRAND a proposé le terme de

peroxydiastases afin d'éviter une confusion de ces enzymes avec les oxydases.

Théorie de Chodat et Bach sur les ferments oxydants

Enfin une étude méthodique et très approfondie des peroxydases a été entreprise par MM. CHODAT et BACH (31) depuis quelques années. Ces savants sont les auteurs d'une théorie des ferments oxydants qui a fait de nombreux adeptes, surtout en Allemagne.

D'après la conception de ces auteurs, les oxydases seraient constituées par un système complexe oxygénase-peroxyde-peroxydase et le phénomène d'oxydation s'effectuerait en deux temps. Dans la première phase, il se formerait par l'intermédiaire d'une diastase qu'ils nomment oxygénase un peroxyde instable qui, dans la seconde phase, abandonnerait son oxygène à la peroxydase, laquelle le transporterait à son tour sur les corps oxydables. En d'autres termes, la peroxydase jouerait le rôle d'intermédiaire entre le peroxyde instable sans cesse renouvelé par l'oxygénase et la substance à oxyder. Un des principaux arguments mis en avant par ces auteurs pour appuyer leur théorie, c'est l'identité des réactions que fournissent à la fois les *oxydases* et les *peroxydiastases* en présence de peroxyde d'hydrogène.

En effet, dans les deux cas, nous voyons les mêmes composés phénoliques de la série aromatique donner naissance par oxydation aux mêmes produits (quinhydrone, tétragaïa-coquinone, purpurogalline, etc.). Les mêmes auteurs expliquent à l'aide de leur théorie pourquoi l'on rencontre des peroxydiastases dans un grand nombre de macérations végétales, fraîches ou anciennes, lesquelles n'exercent par elles-mêmes aucune action oxydante. Ces peroxydiastases doivent avoir une raison d'être. Elles proviennent, disent les auteurs, du dédoublement de l'oxydase, c'est-à-dire du système oxygénase-peroxyde-peroxydiastase (oxydase?). Dans ce système,

l'un des facteurs, le peroxyde, est d'une fragilité extrême et disparaît dès que le végétal a été soumis à la macération aqueuse; un autre facteur, la peroxydiastase résiste très longtemps aux causes de destruction. Le point faible de cette argumentation, c'est que l'on n'a pas démontré d'une façon satisfaisante l'existence des peroxydes dans les végétaux où l'on rencontre des peroxydases. Les expériences sur lesquelles elle se base n'ont d'ailleurs point entraîné ma conviction. BACH a bien observé qu'en pratiquant des touches à l'aide d'iodure de potassium amidonné sur des coupes fraîches de végétaux, il se développe une coloration bleue fugace; mais est-ce là une preuve suffisante de l'existence de peroxydes? D'autre part, CHODAT et BACH décrivent une expérience où ils ont par précipitation fractionnée dédoublé une oxydase en ses composantes : les portions ainsi séparées, prises isolément, sont inactives, mais lorsqu'on les réunit, on peut reproduire faiblement des actions d'oxydases. Sans vouloir être hostile en principe à cette théorie des plus séduisantes, j'estime qu'elle a besoin, pour conquérir tous les suffrages, de s'étayer sur des arguments plus solides. Les expériences qui lui servent de base ne sont, à mon avis, ni assez nombreuses, ni assez démonstratives.

Un fait est certain cependant, c'est que l'on constate la présence de peroxydiastases dans la plupart des végétaux. Pourrait-on d'ailleurs expliquer le rôle des peroxydiastases dans la nature sans admettre l'existence de leur complément : le peroxyde? CHODAT et BACH ne le pensent pas.

Nous verrons dans la seconde partie de ce travail que l'on peut obtenir artificiellement des oxydations très énergiques par fixation d'oxygène atmosphérique sans avoir recours aux peroxydes; mais d'autre part nous citerons des cas où la théorie de BACH et CHODAT semble justifiée par des faits nouveaux dont il sera question plus loin à propos de l'oxydation du gaïacol.

Résumé des travaux de l'auteur

Combinaisons organiques du fer qui peuvent jouer le rôle de peroxydiastases ou d'oxydases

Mes observations m'ont amené de mon côté à une étude méthodique de certains phénomènes d'oxydation.

J'ai montré tout d'abord que certaines combinaisons du fer et particulièrement le ferrocyanure de fer colloïdal (32) peuvent jouer le rôle de peroxydiastases dont ils possèdent les propriétés essentielles (33). Etendant le cercle de mes recherches, j'ai pu reproduire des phénomènes oxydasiques par l'action combinée des alcalis ou de sels alcalins facilement hydrolysables et de ferrocyanure de fer (34). Les remarques faites au cours de ces dernières expériences m'ont alors suggéré l'idée d'examiner les macérations de champignons riches en oxydases, au point de vue de leur réaction et des conséquences que peut avoir cette réaction sur les phénomènes oxydasiques. C'est ainsi que j'ai pu mettre en évidence quelques propriétés nouvelles des oxydases de certains champignons du genre *Russule* (35); poursuivant mon étude, j'ai signalé les analogies qui peuvent exister entre les oxydases artificielles et les oxydases naturelles relativement à leur activation par les mêmes sels (36). Enfin, j'ai pu reproduire artificiellement des phénomènes oxydasiques ayant un caractère de spécificité bien marqué (37). Les nombreuses observations que j'ai eu l'occasion de faire au cours de cette étude m'ont conduit à des vues théoriques nouvelles que j'exposerai à la fin de ce travail. Ces vues cadrent bien avec la conception d'ARTHUS, où il substitue « la notion de l'enzyme propriété à la notion de l'enzyme substance » et où il propose de considérer les enzymes non comme des substances matérielles, mais comme des propriétés de substances matérielles » (38).

CHAPITRE II

SUR QUELQUES PHÉNOMÈNES D'OXYDATION

J'ai été amené indirectement à m'occuper de phénomènes d'oxydation, au cours de recherches faites en commun avec M. A. FERNBACH, sur la liquéfaction des empois d'amidon. L'idée directrice dans la voie nouvelle que je me suis tracée a eu pour point de départ les observations que j'ai faites sur l'oxydation rapide des empois de fécule sous l'influence combinée de l'eau oxygénée et des sulfates de fer ou de cuivre. Il suffit, en effet, d'ajouter des traces de ces sels à un empois ayant reçu quelques milligrammes d'eau oxygénée pour observer une liquéfaction presque instantanée de l'empois d'amidon. Cette transformation n'a lieu qu'à une température voisine de 65-70°. Le résultat de ces recherches faites en collaboration avec M. FERNBACH a été consigné par ailleurs (39). Après avoir constaté que certaines matières colorantes (hélianthine, fuchsine, etc.) s'oxydent déjà à froid, avec une grande facilité sous l'influence combinée de l'eau oxygénée et du sulfate ferreux, j'ai été conduit à penser que les combinaisons du fer étaient capables de jouer un rôle prépondérant dans les phénomènes d'oxydation provoqués par les diastases oxydantes, et que c'était à des combinaisons de fer qu'il fallait s'adresser pour obtenir des actions semblables. Me basant donc sur mes expériences antérieures, j'ai cherché à obtenir avec des combinaisons du fer des actions analogues à celles des peroxydiastases en présence d'eau oxygénée. La peroxy-

diastase est d'une étude relativement simple ; on peut à l'aide de cet agent oxydant et de l'eau oxygénée, obtenir très vite et très facilement des réactions caractéristiques (tétragaïacoquinone avec le gaïacol, purpurogalline avec le pyrogallol, quinhydrone avec l'hydroquinone, etc.). J'ai essayé de reproduire des actions analogues avec différentes combinaisons du fer. Dans ces recherches, j'ai essayé également l'action des sels de cuivre et d'un grand nombre de sels métalliques de la famille du fer, vanadium, nickel, cobalt. *Seules quelques combinaisons du fer m'ont permis d'arriver au résultat désiré. Parmi les autres sels, je n'en ai pas trouvé possédant des propriétés aussi caractéristiques.* Je n'ai pu obtenir même avec les sels de manganèse, en combinant leur action à celle de l'eau oxygénée, ni purpurogalline, ni tétragaïacoquinone.

Action du sulfate ferreux sur la teinture de gaïac. — J'ai d'abord constaté que le sulfate ferreux peut produire avec la teinture de gaïac fraîche ou partiellement oxydée par vieillissement des actions très voisines de celles qu'on observe avec les peroxydiastases. La sensibilité de la réaction est extrême. En opérant sur la teinture de gaïac vieillie on observe une coloration bleue très intense avec des solutions de sel à 100 milligrammes par litre, mais la coloration est encore sensible avec une dilution à 6 millièmes. Si l'on emploie de la teinture de gaïac fraîche, on n'obtient aucune coloration, à moins d'ajouter une trace d'eau oxygénée, et dans ce cas la réaction est encore intense dans une dilution de sulfate ferreux inférieure à 1 millième. Cette réaction ressemble donc beaucoup à celle qu'on obtient si on emploie un extrait végétal renfermant une peroxydase. Des doses très faibles d'acides minéraux suffisent pour empêcher la réaction produite par le sulfate ferreux, comme celle des peroxydases. Toutefois si l'on pousse plus loin la comparaison entre les peroxydases et le sulfate ferreux, on remarque que ce sel ne se comporte pas vis-à-vis des polyphénols et H^2O^3 comme l'enzyme et qu'il donne des produits d'oxydation différents (1).

1. Le sulfate de fer peut donner, il est vrai, lorsqu'on l'emploie avec

Propriété des ferrocyanures alcalins. — Si d'autre part on examine vis-à-vis de ces mêmes phénols et de peroxyde d'hydrogène, l'action d'un ferrocyanure alcalin, on voit qu'à des doses relativement fortes ce dernier peut donner les produits d'oxydation caractéristiques que l'on obtient avec l'enzyme, mais on ne peut obtenir comme avec le sulfate de fer le bleuissement de la teinture de gaïac.

Les propriétés curieuses des ferrocyanures alcalins méritent de retenir un instant l'attention. Il est intéressant d'étudier l'action combinée de ces sels et de l'eau oxygénée sur l'hydroquinone.

La solution de ferrocyanure de potassium qui m'a servi dans mes expériences est à 2 p. 100. Une goutte de cette solution contient 1 mgr. de $K^4FeCy^6 + 3 Aq$ ou 0 mgr. 13 de Fe.

Si l'on ajoute à 0 cc. 6 d'une solution saturée d'hydroquinone, 2 gouttes de la solution de ferrocyanure et 4 à 5 gouttes d'eau oxygénée neutre à 10 volumes, il se produit des cristaux de quinhydrone au bout de 15 à 20 minutes, et l'on voit leur nombre augmenter progressivement. Lorsqu'on filtre au bout de 30 minutes, le liquide, qui passe clair, laisse déposer peu à peu de nouveaux cristaux de quinhydrone. On peut répéter l'opération plusieurs fois, toujours avec le même succès; il suffit de rajouter quelques gouttes d'eau oxygénée.

La formation des cristaux de quinhydrone est d'autant plus rapide que la solution d'hydroquinone est plus concentrée. La vitesse de la réaction croît avec la quantité de ferrocyanure en présence.

EXEMPLE				
		Ferrocyanure de K		
		1 goutte = 1 mg.		
		K ₄ FeCy ₆		
		1 goutte = 0 mg.		
Hydroquinone				
Solution				
saturée à froid	Eau ajoutée		H ² O ² à 10 vol.	Temps écoulé
12 gouttes	0	2 gouttes	5 gouttes	10 min
12 —	0	1 —	5 —	15 —
12 —	20 gouttes	1 —	5 —	45 —
12 —	30 —	1 —	5 —	∞

ménagements, de très petites quantités de purpurogalline avec le pyrogallol et H^2O^2 .

N.-B. — La réaction colorée que donne avec l'hydroquinone le sulfate ferreux en présence de H^2O^2 est d'une extrême sensibilité et permet de déceler le fer à la dilution de 1 millionième. Le sulfate ferrique a une activité six fois moindre, ce qui veut dire que, à dose égale, il faut six fois plus de temps pour arriver au même résultat. La moindre trace d'acide minéral retarde considérablement ces réactions.

Analogie entre le ferrocyanure de potassium et la peroxydase du malt. — On observe des différences analogues en opérant avec la peroxydiastase du malt.

Hydroquinone Solution saturée à froid	Eau ajoutée	Macération de malt à 10 0/0	H ² O ₂ à 10 vol.	Temps écoulé
12 gouttes	0	20 gouttes	5 gouttes	15 min.
12 —	20 gouttes	20 —	5 —	45 —
12 —	30 —	20 —	5 —	∞

Influence de la concentration de l'hydroquinone. — Nous verrons plus loin que ce n'est pas la trop grande dilution des catalyseurs qui empêche la réaction de se produire, mais que cela tient à la concentration insuffisante de l'hydroquinone ; ceci est vrai dans le cas du ferrocyanure comme dans celui de la peroxydase du malt.

En effet, si l'on étudie l'influence de la dilution des deux catalyseurs vis-à-vis d'une solution concentrée d'hydroquinone, on voit que les choses se passent tout différemment.

Hydroquinone Solution saturée à froid	Ferrocyanure de K. 1 goutte = 1 mgr.	H ² O ₂ à 10 vol.	Temps écoulé
10 gouttes	1 goutte	6 gouttes	15 min.
20 —	1 —	6 —	30 —
30 —	1 —	6 —	38 —
40 —	1 —	6 —	43 —
60 —	1 —	6 —	63 —
Macération diast.			
à 10 p. 100			
60 —	20 gouttes	6 —	30 —

On constate que vis-à-vis d'une solution concentrée d'hydroquinone, la réaction se ralentit d'autant plus que le ferrocyanure alcalin est plus dilué.

Si, d'autre part, on compare cette expérience avec la précédente, on remarque que ce n'est pas la dilution trop grande des catalyseurs qui a empêché la manifestation du phénomène dans la première expérience, car avec une dilution double, elle se produit encore dans la seconde. C'est donc la concentration insuffisante de l'hydroquinone qui s'oppose dans la première expérience à la formation des cristaux de quinhydrone.

Si nous comparons maintenant l'activité des ferrocyanures et des ferri-cyanures alcalins vis-à-vis du même réactif, nous constatons que ces derniers agissent beaucoup plus lentement. Il y a entre eux, au point de vue de leur activité, un rapport semblable à celui qui existe entre les sulfates ferreux et ferrique dans les phénomènes d'oxydation signalés plus haut. Des traces d'acides minéraux retardent aussi bien l'action des ferrocyanures que celle des ferri-cyanures.

CHAPITRE III

PRÉPARATION DU FERROCYANURE DE FER COLLOÏDAL SON ACTION SUR L'HYDROQUINONE

Lorsqu'on met en contact des solutions extrêmement diluées de ferrocyanure de potassium et de sulfate ferreux on obtient un ferrocyanure de fer colloïdal. Celui-ci employé à des doses *infimes* permet de reproduire les réactions caractéristiques des peroxydiastases (bleuissement de la teinture de gaïac, formation de quinhdrone avec l'hydroquinone, de tétragaïacoquinone avec le gaïacol, de purpurogalline avec le pyrogallol, coloration violette avec le chlorhydrate de tétraméthylparaphénylènediamine).

Voyons dans quelles proportions il faut mélanger les deux solutions pour arriver à produire l'effet optimum.

Pour résoudre cette question, il suffit d'ajouter à une quantité constante de ferrocyanure alcalin des doses progressives de sulfate ferreux et de mettre les produits de la réaction en contact avec un même volume d'une solution saturée d'hydroquinone. Dans une série d'essais ainsi préparés, et dont on trouve un exemple plus loin, on ajoute rapidement 2 gouttes d'eau oxygénée à 10 volumes (Merck), puis on note les temps au bout desquels on voit apparaître les cristaux de quinhdrone. Il est évident que pour avoir les proportions optima des deux sels, il faut choisir les doses qui correspondent à la plus grande vitesse de réaction (1). Il est indispensable de répéter les essais un grand nombre de fois et dans les

1. Lorsqu'on répète les mêmes expériences en remplaçant l'hydroquinone par 2 cc. d'une solution de gaïacol à 2 p. 100, on observe des effets tout à fait analogues. Les mêmes doses qui favorisent ou contrarient la formation de quinhdrone favorisent aussi ou contrarient la formation de tétragaïacoquinone.

mêmes conditions, car la réaction est souvent contrariée par des causes qui échappent à l'observation (analogie avec les diastases).

Quant aux doses et à la dilution des sels mis en présence nous avons adopté, après quelques tâtonnements, les proportions indiquées en haut du tableau.

Pour compter les gouttes, je me sers du compte-gouttes Duclaux (20 gouttes = 1 cc.).

Ferrocyanure potassium 1 g. = 0mg.033 K_4Cy^6Fe + 3 Aq = 0 mg. 0043 Fe	Sulf. ferreux 1 g. = 0 mgr. 00427 SO^4Fe = 0 mgr. 0018 Fe	Eau ajoutée pour amener au même volume	Sol. Hydroq. saturée à froid	H_2O_2 à 10 volumes	Temps
1 goutte	0 goutte	9 gouttes	12 gouttes	2 gouttes	150'
1 —	2 —	7 —	12 —	2 —	6'15
1 —	3 —	6 —	12 —	2 —	4'
1 —	4 —	5 —	12 —	2 —	2'15
1 —	5 —	4 —	12 —	2 —	2'15
1 —	6 —	3 —	12 —	2 —	4'30
1 —	7 —	2 —	12 —	2 —	5'30
1 —	8 —	1 —	12 —	2 —	11'30
1 —	9 —	0 —	12 —	2 —	∞

Ce qui frappe à première vue, c'est la disproportion des effets obtenus à l'aide du ferrocyanure alcalin seul où à l'état de combinaison avec le fer. Il faut aussi noter que dans le cas où l'on emploie le ferrocyanure de K seul les cristaux de quinhydrone qui commencent à apparaître au bout de 2 h. 1/2 ne se forment qu'avec une lenteur extrême. Avec le ferrocyanure de fer, la formation des cristaux est très rapide et la réaction s'achève très vite.

Le tableau nous montre aussi que, vis-à-vis de 1 goutte de ferrocyanure de potassium = 0 mgr. 033 ($K^4FeCy^6 + 3Aq$), il faut employer 4 ou 5 gouttes de sulfate ferreux = 0 mgr. 017 ou 0 mgr. 0213 (SO^4Fe) pour produire l'effet optimum (1). J'ai pris les chiffres moyens d'un certain nombre d'expériences. Ces chiffres correspondent pour l'optimum d'activité à 0 mgr. 033 de $K^4FeCy^6 + 3Aq$ pour 0 mgr. 017 de sulfate ferreux (SO^4Fe) renfermant 0 mgr. 0072 de Fe.

1. Avec le sulfate ferrique, l'action est beaucoup moins énergique qu'avec le sulfate ferreux, ainsi que me l'ont montré des essais comparatifs.

Le ferrocyanure de potassium se comporte d'une façon analogue avec les sulfates ferreux et ferrique.

*Sur la composition du ferrocyanure de fer colloïdal
et sa préparation rapide*

Un calcul très simple montre que pour la même dose de ferrocyanure (0 mgr. 033) il suffit de 0 mgr. 00577 de fer sous forme de sulfate pour obtenir du bleu de Prusse (ferrocyanure ferrique). Le ferrocyanure de fer colloïdal qui semble, comme nous allons le voir plus loin, un composé bien défini est donc un peu plus riche en fer que le bleu de Prusse.

Si nous jetons encore un coup d'œil sur le tableau précédent, nous voyons qu'en deçà comme au delà de la dose optimale, l'activité décroît et lorsqu'on dépasse une très faible dose de sulfate ferreux, la réaction ne se produit plus (du moins elle est suffisamment troublée pour que l'on n'observe plus la formation de cristaux de quinhydrone).

Enfin lorsque l'on combine les deux sels dans les proportions et dans les conditions de dilution que j'ai fixées plus haut pour obtenir l'optimum d'activité, on obtient un ferrocyanure de fer colloïdal qui ne renferme plus trace de l'un ou l'autre composant. S'il existe encore de faibles doses de ces sels à l'état de liberté, je n'ai pu les mettre en évidence par les méthodes purement chimiques. Ce fait se démontre facilement par la filtration du colloïde au travers d'un sac en collodion. Non seulement le liquide qui filtre incolore a perdu toute son activité, mais on ne peut plus déceler dans celui-ci la moindre trace de l'un ou l'autre des composants. Il semble donc que l'on ait affaire ici à un composé bien défini, plus riche en fer que le ferrocyanure ferrique. Toutefois, des traces de sel ont pu être retenues sur le colloïde par adsorption.

N.-B. — Il est indispensable, afin d'éviter une coagulation rapide du colloïde, de redistiller avec le plus grand soin l'eau employée pour faire les dissolutions. Si l'on observe bien cette précaution, la fausse solution peut se conserver intacte pendant plusieurs semaines.

Pour préparer rapidement le colloïde, je conseille d'opérer de la façon suivante :

Solution A. — Peser au trébuchet 1 gr. 15 de sulfate ferreux pur anhydre du commerce, faire dissoudre dans l'eau distillée, chauffer encore quelques secondes à l'ébullition dans un matras en verre d'émeraude, et amener le volume un peu au-dessus de 50 cc ; refroidir, compléter les 50 cc. s'il y a lieu et filtrer

Solution a. — A l'aide d'un compte-gouttes Duclaux, on introduit 10 gouttes de cette solution dans un ballon jaugé de 100 cc. et on complète à 100 cc. avec de l'eau distillée.

Solution B. — Dissoudre 2 gr. de ferrocyanure de potassium pur cristallisé du commerce dans l'eau distillée de manière à avoir 100 cc.

Solution b. — Prélever 5 cc. de solution B, les introduire dans un ballon jaugé de 150 cc. ; puis compléter à 150 cc. avec de l'eau distillée.

Pour terminer, mélanger 25 cc. de solution *b* avec les 100 cc. de la solution *a*.

Cette fausse solution peut se conserver pendant plusieurs semaines sans subir d'altération ; c'est elle qui nous a servi dans toutes nos expériences. Il est certain que l'on peut imaginer d'autres modes de préparation du ferrocyanure de fer colloïdal ; mais comme cette question est d'un intérêt secondaire, je ne m'y arrêterai pas.

Sur les propriétés du ferrocyanure de fer colloïdal

La peroxydiastase artificielle, ainsi que nous l'avons déjà vu, et c'est ce qui démontre son caractère colloïdal, perd complètement son activité après passage au travers d'un filtre en collodion. Elle se rapproche des peroxydiastases naturelles par les caractères suivants : elle est filtrable sans perte, sur papier ; des traces d'acide minéraux gênent considérablement son action ; elle perd une partie de son activité après une minute d'ébullition. Elle devient presque inactive lorsqu'on la fait bouillir quelques secondes en présence de phosphates.

Nous savons déjà par nos expériences précédentes que l'action du ferrocyanure de fer colloïdal est entravée par des traces de sulfate ferreux. Des doses très faibles de celui-ci ou de sulfate ferrique empêchent complètement la formation de cristaux de quinquhydrone. Le sulfate de cuivre agit de la même façon. Le sulfate de manganèse n'est pas gênant. L'effet nuisible des sulfates de fer et de cuivre s'explique tout naturellement par l'oxydation brutale de ces sels exercent indivi-

duellement sur l'hydroquinone, oxydation qui s'oppose à l'action ménagée du colloïde. Nous rencontrerons plus loin des effets semblables à propos de l'oxydation du pyrogallol.

L'action du sulfate ferreux et du sulfate de cuivre est d'autant plus intéressante à noter qu'elle se retrouve aussi pour les peroxydiastases naturelles, en particulier pour la peroxydiastase de l'extrait de malt. Avec l'extrait de malt à 10 o/o et fraîchement préparé, les conditions de réaction les plus favorables à la formation de quinhydrone sont, comme lorsqu'il s'agit du fonctionnement de la diastase saccharifiante (40), de la diastase liquéfiant (41) et de la diastase protéolytique contenues dans cet extrait, la neutralité vis-à-vis du méthylorange et toute influence capable d'assurer cette neutralité se trouve favorisante. C'est ce qui permet d'expliquer pourquoi l'addition de sulfate ferreux ou ferrique, ou de sulfate de cuivre, active la formation de quinhydrone, tant que le sel ajouté peut réagir avec les sels de l'extrait de malt. Dès que les sulfates de fer ou de cuivre se trouvent en excès, leur influence gênante se fait sentir.

Enfin, je vais montrer par des mesures précises que le ferrocyanure de fer colloïdal se comporte comme un véritable enzyme, c'est-à-dire qu'il obéit aux mêmes lois et aux mêmes influences que les peroxydiastases naturelles.

Comparaison entre le mode d'action du ferrocyanure de fer et le fonctionnement des peroxydiastases par l'étude de la transformation du pyrogallol en purpurogalline.

J'ai choisi dans ce but (m'inspirant en cette circonstance des travaux de G. BERTRAND et de CHODAT et BACH) comme substratum oxydable le pyrogallol et j'ai par pesée déterminé la purpurogalline formée sous l'influence combinée du colloïde et de l'eau oxygénée.

MÉTHODE EMPLOYÉE POUR LE DOSAGE DE LA PURPUROGALLINE

Mode opératoire. — Pour recueillir et doser la purpurogalline formée, j'ai adopté le dispositif très simple que voici : on garnit d'amiante une

série de creusets de Gooch; mais pour cette opération on a eu soin de mettre au préalable en suspension dans l'eau la fibre minérale finement divisée (non en poudre); puis on agite le mélange, on verse dans le creuset et on laisse égoutter en s'aidant de la trompe. La couche d'amianté ne doit pas dépasser l'épaisseur d'une feuille de papier à cigarettes. Après avoir essayé sa résistance à la trompe, on lave à plusieurs reprises; on s'assure ainsi de la rapidité et de la régularité de la filtration. On essuie l'extérieur du creuset avec précaution et l'ayant placé sur une soucoupe, on le porte ainsi dans une étuve réglée à 100-110°. Après dessiccation, on le pèse jusqu'à poids constant P. Pour la filtration, on introduit la partie inférieure du creuset dans l'ouverture d'un tube évasé à sa partie supérieure et on l'y maintient à l'aide d'une bague en caoutchouc. Le tube pénètre par un bouchon dans un flacon en communication avec une trompe à eau. Dès que l'on a versé sur le filtre les premières portions du liquide, on fait un léger appel d'air à l'aide de la trompe. Quand l'opération a été bien conduite, elle demande en moyenne 3/4 d'heure. On sèche de nouveau à 100, et on pèse jusqu'à poids constant P'. Il va sans dire que, vu la faible solubilité de la purpurogalline, tous les lavages doivent être exécutés de la même façon avec la même quantité d'eau.

P'—P donne le poids de la purpurogalline.

Etude de l'oxydation du pyrogallol

Influence de la dose de colloïde. — J'ai étudié en premier lieu l'action de doses croissantes du colloïde en présence de quantités invariables de pyrogallol et d'eau oxygénée, le volume total du liquide atteignant partout 40 cc. (1).

EXEMPLE

Pyrogallol	Ferrocyanure de fer (1 goutte = 0 mg. 0023 Fe)	Eau oxygénée (1 goutte = 7 mg. 0)	Purpurogalline formée
—	—	—	—
1 gr. 2	4 gouttes	8 gouttes	28 mg.0
1 gr. 2	8 —	8 —	58 mg.0
1 gr. 2	12 —	8 —	68 mg.0
1 gr. 2	16 —	8 —	82 mg.5
1 gr. 2	20 —	8 —	97 mg.5

1. Tous les dosages ont été effectués au bout de 24 heures de contact.

Dans une expérience dans laquelle j'ai employé 2, 4, 6, 8 et 10 gouttes de colloïde, j'ai obtenu les chiffres suivants :

Pyrogallol	Ferrocyanure de fer	Eau oxygénée	Purpurogalline formée
1 gr.2	2 gouttes	8 gouttes	12 milligr.
1 gr.2	4 —	8 —	25 —
1 gr.2	6 —	8 —	38 —
1 gr.2	8 —	8 —	46 —
1 gr.2	10 —	8 —	64 —

Les poids de purpurogalline trouvés représentent une proportionnalité très satisfaisante vis-à-vis les doses de ferrocyanure de fer mises en œuvre, étant donné les difficultés inhérentes au dosage de la purpurogalline formée.

Il résulte de ces expériences que, dans les limites comprises entre 1 et 10 gouttes, le rendement final en purpurogalline est proportionnel à la quantité de colloïde employé, ce qui est conforme à la loi d'action des peroxydases naturelles énoncée par CHODAT et BACH.

A partir de 8 ou 10 gouttes, la proportion de purpurogalline augmente toujours, mais ne croît plus suivant un rapport simple. Au delà de 20 gouttes, les accroissements deviennent de plus en plus faibles et tendent rapidement vers 0.

Pyrogallol	Ferrocyanure de fer colloïdal	Eau oxygénée	Purpurogalline formée
1 gr.2	10 gouttes	8 gouttes	80 mgr. 5
1 gr.2	20 —	8 —	115
1 gr.2	30 —	8 —	127
1 gr.2	40 —	8 —	140
1 gr.2	50 —	8 —	148
1 gr.2	60 —	8 —	140
1 gr.2	70 —	8 —	140

Nous voyons que la limite des accroissements est atteinte avec 40 gouttes ou 2 cc. de colloïde.

Relations entre la masse du catalyseur, la quantité de purpurogalline formée et la vitesse de la réaction. — La rapidité avec laquelle se forme le précipité de purpurogalline est également fonction de la masse du catalyseur ; elle suit donc une marche parallèle aux accroissements.

Colloïde	Purpurogalline formée	Temps au bout duquel on voit apparaître le précipité
10 gouttes	80 mgr. 5	25 minutes
20 —	115	10 —
30 —	127	7 —
40 —	140	5 —
50 —	148	3 —
60 —	140	4 —
70 —	140	4 —

Mais, de même qu'il y a une limite pour l'augmentation du précipité, il y en a une pour la vitesse de la réaction.

Influence de la dose d'eau oxygénée. — J'ai recherché ensuite quelle est, toutes choses égales d'ailleurs, l'influence de doses croissantes d'eau oxygénée sur le rendement en purpurogalline. J'opère, comme dans les expériences précédentes et comme dans toutes celles qui vont suivre, sur 1 gr. ou 1 gr. 2 de pyrogallol et sur un volume total de 40 cc. de liquide.

Ferrocyanure de fer colloïdal 10 gouttes = 0 mgr. 023 Fe	Eau oxygénée 1 goutte = 7 mgr. Ox	Purpurogalline
10 gouttes	3 gouttes	30 mg. 0
10 —	6 —	46 mg. 5
10 —	9 (63 mgr. de o)	64
10 —	12 gouttes	72
10 —	15 —	—
10 —	18 —	85
0 —	18 —	Néant

On constate jusqu'à 63 mgr. d'oxygène un accroissement régulier du poids de purpurogalline. A partir de ce point, l'augmentation est de plus en plus faible.

Notons en passant que, par rapport au fer contenu dans 10 gouttes de colloïde, le rendement de 85 milligrammes représente 3.680 fois le poids de ce fer. Ces proportions sont de l'ordre de celles que l'on retrouve avec les diastases.

Influence des acides et des sels sur la marche de la réaction.

— Si nous examinons l'action d'un acide minéral, nous voyons que de très faibles doses de celui-ci retardent considérablement la réaction et diminuent le rendement.

Pyrogallol	Ferrocyanure de fer colloïdal	SO ⁴ H ²	Proportion de SO ⁴ H ² en millièmes	H ² O ²	Purpurogalline
1 gramme	20 gouttes	0	0	5 gouttes	83 mgr.
1 —	20 —	2 mgr. 5	62,5	5 —	58 mgr.5
1 —	20 —	5	0 125	5 —	33 mgr.5

Le précipité de purpurogalline qui apparaît au bout de 15 minutes en milieu neutre ne se produit qu'après une heure en présence de traces de SO⁴H² et, dans ce cas, il n'augmente qu'avec une très grande lenteur.

L'influence de très faibles doses de sulfate de fer et de sulfate de cuivre est plus particulièrement intéressante à noter, surtout si on la compare à l'action de doses équimoléculaires de sulfate de manganèse.

Ferrocyanure de fer colloïdal 20 gouttes = 0 mgr. 046 Fe	Eau oxygénée 1 goutte = 7 mgr. Ox	Sels ajoutés	Purpurogalline
20 gouttes	5 gouttes	0	88 mgr.
20 —	5 —	0 mgr.85 SO ⁴ Fe	24
20 —	5 —	0 mgr.89 SO ⁴ Cu	24
20 —	5 —	0 mgr.84 SO ⁴ Mn	81

Nous voyons que des traces de sulfate de fer et de cuivre gênent considérablement la réaction et réduisent le rendement au quart alors que le sulfate de manganèse n'a pas d'influence sensible sur la marche du phénomène. Nous avons déjà eu l'occasion de constater au cours de ce travail que des traces de sulfate de fer ou de cuivre exercent une action semblable sur l'hydroquinone. D'après des expériences récentes, de M. de STROECKLIN (42), les mêmes effets nuisibles de sulfate de fer se remarquent pour la peroxydiastase naturelle.

Pour montrer jusqu'à quel point le sulfate de fer peut troubler la réaction, citons encore l'exemple suivant :

Pyrogallol	Ferrocyanure de fer	Eau oxygénée	SO ⁴ Fe	Purpurogalline
1 gramme	20 gouttes	4 gouttes	0	67 mgr.5
1 —	20 —	4 —	0 mgr.042	59 mgr.
1 —	20 —	4 —	0 mgr.082	57 mgr.5
1 —	20 —	4 —	0 mgr.124	54 mgr.5
1 —	20 —	4 —	0 mgr.166	48 mgr.

Examinons enfin quelle est l'influence exercée par quelques sels sur la marche de l'oxydation.

Ferrocyanure de fer colloïdal	Eau oxygénée	Sels ajoutés	Purpurogalline
20 gouttes	10 gouttes	0	108 mgr. 5
20 —	10 —	20 mgr. SO^4Mg	104 mgr. 5
20 —	10 —	20 mgr. NaCl	97 mgr.
20 —	10 —	20 mgr. $\text{PO}^4\text{H}^2\text{K}$	61 mgr.
20 —	10 —	20 mgr. PO^4HNa^3	113 mgr.
20 —	10 —	0 mgr. 4 NaOH	110 mgr. 5

Il ressort de ce tableau que, seul parmi les sels employés à la dose de 20 mgr. le phosphate acide de potassium exerce une action nettement nuisible.

Les choses se passent de même pour la peroxydiastase naturelle étudiée par M. de STOECKLIN (43).

Enfin voici pour terminer une expérience où les dosages ont été effectués au bout de 48 heures de contact au lieu de 24 heures :

Ferrocyanure de fer colloïdal	Eau oxygénée	Sels ajoutés	Purpurogalline
20 gouttes	10 gouttes	0	108 mgr. 5
20 —	10 —	20 mgr. $\text{PO}^4\text{H}^2\text{K}$	77 mgr. 5
20 —	10 —	20 mgr. PO^4HNa^3	117 mgr. 5
20 —	10 —	2 mgr. NaOH	126 mgr. 5

Ici nous constatons qu'une légère alcalinité exerce une influence nettement favorable sur le rendement. Pour le reste, cette expérience est comparable à la précédente.

Si nous notons maintenant les vitesses de réaction, nous voyons qu'elles sont influencés dans le même sens.

Purpurogalline formée	126 mgr. 5	117 mgr. 5	108 mgr. 5	77 mgr. 5
Temps au bout duquel apparaît le précipité . .	6 min.	10 min.	17 min.	41 min.

Ces chiffres nous montrent, comme on devait s'y attendre, qu'il existe une relation très étroite entre la vitesse de la réaction et le rendement.

Je ne me dissimule pas, malgré le grand nombre d'expériences citées, qu'il reste encore de nombreux cas à examiner, notamment l'influence exercée par les divers acides organi-

ques (1) sur la marche de la réaction ; mais, étant donné le but que je poursuis, je crois pouvoir m'arrêter là, quitte à reprendre plus tard des questions de détail. Ce que j'ai voulu démontrer, c'est qu'il peut exister des combinaisons du fer jouissant des propriétés essentielles des enzymes peroxydasiques. L'importance de cette constatation s'accroît du fait de la présence si générale de ces enzymes et du fer dans les organismes vivants.

Je n'entreprendrai pas de citer toutes les substances du règne animal ou végétal dans lesquelles on rencontre ces diastases. Je me contenterai de dire qu'il n'est pas une feuille, un brin d'herbe, où l'on ne puisse les mettre en évidence.

Expériences de M. J. Sarthou sur la schinoxydase du faux poivrier

Le rôle actif que peut jouer le fer dans le mécanisme de de certains ferments oxydants (peroxydases) avait déjà été entrevu par SPITZER (44). Plus récemment, M. J. SARTHOU (45) a également émis l'hypothèse que le fer semble jouer un rôle capital dans le fonctionnement d'une *oxydase* qu'il a découverte dans le latex du *Schinus Molle*, arbre très commun en Algérie. Les conclusions qu'il tire de son travail me paraissent trop importantes pour être passées sous silence.

« Il semble, dit-il : 1° que le fer joue dans la schinoxydase
« le même rôle que le manganèse dans la laccase de
« M. G. BERTRAND ;

« 2° Que le fer à l'état ferreux jouit de la propriété de céder
à certains corps facilement oxydables une partie de l'oxygène
« qu'il emprunte à l'air ;

« 3° Que le fer en combinaison organique avec C et H pos-
« sède très peu cette propriété ;

1. L'influence exercée par certains acides sur la peroxydiastase a été étudiée dans un travail récent de M. G. BERTRAND et Mlle ROZENBAND, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXIII, avril 1909.

« 4° Que le fer en combinaison organique avec Az et CAz jouit de cette propriété à un haut degré ;

« 5° Que, pour une même quantité de fer, les quantités d'oxygène transmis varient suivant l'état de combinaison de ce fer. »

Analogies entre les observations de J. Sarthou et celles de l'auteur. — On voit qu'il y a une très grande analogie entre les observations de M. SARTHOU et les miennes. Qu'il s'agisse de fixation directe de l'oxygène de l'air sur les phénols ou d'oxydation de ces mêmes phénols, par l'intermédiaire de H^2O^2 , c'est le groupement CAz combiné au fer qui constitue le système ou le catalyseur le plus actif. Toutefois les résultats de M. SARTHOU diffèrent des miens en ce sens qu'il n'a pas reproduit avec le cyanure de fer des effets identiques à ceux que l'on observe avec les oxydases, alors que j'ai obtenu avec le ferrocyanure de fer colloïdal, non seulement les réactions caractéristiques des peroxydases, mais encore, et c'est ce qui distingue essentiellement les actions diastasiques des actions chimiques proprement dites, la disproportion entre la quantité de matière agissante et la quantité d'effet produit. Il n'est peut être pas téméraire de prévoir que l'on pourra reproduire dans l'avenir, à l'aide de certaines combinaisons du fer, les réactions caractéristiques des oxydases du type de la schinoxydase de M. SARTHOU.

**Observations de M. E. de Stoecklin et de l'auteur
au sujet de l'action spécifique de certaines combinaisons du fer**

Ce qui vient à l'appui de ma manière de voir à ce sujet, ce sont les observations très curieuses consignées dans un travail que j'ai publié en collaboration avec M. E. de STOECKLIN (46). Dans ce mémoire, nous faisons ressortir que, suivant qu'on engage le fer dans telle ou telle combinaison, il peut acquérir telle ou telle propriété spécifique.

Ainsi le ferrocyanure de fer colloïdal qui, par ailleurs, se

comporte exactement comme une peroxydiastase, n'a aucune action sur l'oxydation de IH par H^2O^2 . D'autre part, le sulfo-cyanate de fer présente la particularité remarquable de fonctionner dans la décomposition de IH par H^2O^2 sensiblement comme la peroxydase ordinaire, tandis qu'il est incapable de réagir sur les phénols comme le font à la fois ces peroxydases et le ferrocyanure de fer colloïdal.

Cette constatation, appuyée sur d'autres observations, nous a permis de tirer les conclusions suivantes : *Dans l'ensemble des actions catalytiques dues aux peroxydases, il faut mettre à part, comme étant la fonction spécifique d'un enzyme particulier, celle qui consiste à activer la décomposition de IH par H^2O^2 .*

Notion nouvelle relative aux actions spécifiques

Parmi les faits nouveaux que j'ai mis en lumière dans cette partie de ma thèse, il en est un surtout qui, corroboré par d'autres exemples puisés dans la littérature de ces dernières années (BERTRAND, TRILLAT) (1), mérite de retenir l'attention, car il permet de formuler la proposition suivante :

« *La spécificité d'un catalyseur oxydant (ici le fer, là le manganèse) est fonction de la combinaison chimique dont il fait partie ; c'est-à-dire qu'elle varie avec la nature du composé organique auquel s'allie le métal* ». Il serait désirable que l'on pût étendre cette notion nouvelle à des actions catalytiques ou diastatiques d'un ordre différent (2) ; peut être sera-t-on alors en

1. G. BERTRAND avait déjà montré que, suivant la nature du radical acide des sels de manganèse, l'oxydation de l'hydroquinone présentait des caractères différents, tant au point de vue de l'intensité qu'au point de vue de la nature des produits formés. D'autre part, M. TRILLAT a pu obtenir le manganèse sous une forme qui lui permet d'oxyder facilement le pyrogallol en le transformant en purpurogalline. Enfin, M. TRILLAT n'obtient pas de cristaux de quinhidrone en oxydant l'hydroquinone à l'aide de son composé

2. Ne peut-on admettre que pour des actions diastatiques ou catalytiques hydrolysantes, par exemple, le groupement COOH puisse jouer le même rôle que le métal dans les actions oxydasiques ?

état d'expliquer et même de provoquer le mécanisme d'un grand nombre de phénomènes présentant un caractère de spécificité. Empruntant à E. FISCHER sa comparaison célèbre, j'estime qu'il sera possible dans un avenir prochain de forger les clefs qui permettront d'ouvrir un grand nombre de serrures.

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE IV

SUR QUELQUES PHÉNOMÈNES OXYDASIQUES ARTIFICIELS

Les résultats nouveaux que je viens d'obtenir justifient les conclusions de la première partie de mon travail. En effet, j'ai laissé entrevoir dans ces conclusions la possibilité d'arriver à fixer directement sur un phénol l'oxygène de l'air à l'aide d'une combinaison du fer ; toutefois, ce que je n'avais pas prévu alors et ce que je viens de mettre en évidence aujourd'hui, c'est que, à côté de cette combinaison du fer, il faut faire intervenir d'autres facteurs pour observer des phénomènes d'oxydation directe. Nous verrons plus tard quelle elle est la part qui doit revenir à chacun d'eux. Pour le moment je tiens à respecter l'ordre chronologique des faits que j'ai observés et je décrirai ces phénomènes d'oxydation tels qu'ils me sont apparus tout d'abord, puis j'en ferai une analyse détaillée.

Influence combinée des alcalis ou des sels et du ferrocyanure de fer sur l'hydroquinone

Lorsqu'on met dans une solution saturée d'hydroquinone de l'ammoniaque à la dilution de 4/100.000 avec du fer à la

dilution de 1/100.000 sous forme de ferrocyanure de fer, on obtient au bout de 12 à 15 minutes d'abondants cristaux de quinhydrone. On favorise beaucoup l'oxydation en agitant le tube où la réaction a lieu. Avec les faibles doses indiquées ci-dessus, on est encore loin d'avoir atteint, en ce qui concerne le fer, la limite de sensibilité. On peut, en effet, abaisser encore 25 fois la dilution de ce métal, à la condition d'employer une solution alcaline de 5/100.000, et observer encore des effets très sensibles. La réaction est d'une intensité très grande lorsque, dans 1 cc. d'une solution d'hydroquinone à 5,5 o/o on ajoute 0 mgr. 002 de fer, toujours sous la même forme, et 0 mgr. 5 de NH^4 . On obtient alors au bout de 2 minutes, en agitant vivement la liqueur, une telle quantité de cristaux que le mélange se prend en masse. En opérant sur une grande quantité de solution d'hydroquinone et en filtrant de 5 minutes en 5 minutes, on voit la réaction se poursuivre d'une façon ininterrompue pendant très longtemps. Le liquide d'un tube témoin sans fer, agité en même temps, se colore en brun sous l'influence de l'alcali seul et ne donne naissance qu'à quelques rares cristaux. On peut remplacer dans ces expériences l'ammoniaque par un alcali quelconque ou un carbonate alcalin.

Dans l'une des nombreuses expériences où j'ai fait agir sur une solution de 1 gr. 4 d'hydroquinone dans 25 cc. d'eau 5 milligr. de NH^3 et 0 mgr. 04 de fer à l'état de ferrocyanure, j'ai obtenu après une heure d'agitation 267 milligr. de quinhydrone, ce qui représente 6.675 fois le poids du fer mis en œuvre. Le poids d'oxygène nécessaire à cette transformation est de 19 mgr. 22 et son volume de 13 cc. 7.

Une expérience conduite parallèlement, avec la même proportion d'alcali, mais sans fer, n'a fourni que 2 à 3 milligr. de quinhydrone; avec du fer sans alcali, on n'observe rien.

Si la dose d'alcali ajouté est trop grande, si elle atteint, par exemple, 100, l'oxydation par l'air se poursuit trop vite et il ne se forme plus de cristaux.

Ces phénomènes, par leur rapidité, leur caractère de conti-

nuité et la disproportion entre la cause et l'effet peuvent donc être assimilés aux actions diastasiques les plus énergiques. Nous verrons plus loin quelle est la part de l'alcali et quelle est celle du fer dans cette action combinée.

L'intensité et la rapidité de la réaction étant proportionnelles, toutes choses égales d'ailleurs, à la quantité d'alcali mise en œuvre, on peut prévoir que les oxydes alcalino-terreux (eau de chaux, par exemple) et les sels à alcalinité faible, tels que les bicarbonates alcalino-terreux ou les biphosphates alcalins, par exemple, exerceront une action oxydante beaucoup moins énergique, mais encore considérable. C'est ce que j'ai observé, par exemple, avec toutes les eaux calcaires bicarbonatées, comme l'eau ordinaire du laboratoire et même une eau peu minéralisée comme l'eau d'Evian. Il suffit de faire dissoudre l'hydroquinone à la concentration de 5,5 o/o dans l'une ou l'autre de ces eaux pour obtenir par addition de colloïde, à raison de 0 mgr. 01 par centimètre cube des phénomènes d'oxydation comparables (au point de vue de la formation de cristaux de quinhedrone) à ceux qu'on observe dans les mêmes conditions et avec des doses massives des sels de manganèse les plus actifs.

Le phosphate disodique, à la dose de 2 mgr. 8 produit dans 1 cc. d'une solution à 5,5 o/o d'hydroquinone et en présence de la même quantité de fer, des effets analogues.

Analogie entre le mode d'action des sels de manganèse et de quelques sels alcalins. Influence de la réaction alcaline

On voit par ce qui précède que l'alcalinité du milieu joue un rôle capital dans ces phénomènes d'oxydation. Il y a certainement là un rapprochement à faire avec les sels de manganèse à acides faibles, dont M. GABRIEL BERTRAND, dans un travail resté classique, a découvert les effets oxydants sur l'hydroquinone, et l'on est en droit de se demander s'ils ne doivent pas en partie leur activité à leur réaction nettement alcaline.

line. En effet, lorsqu'on examine la solution aqueuse de ces divers sels, on trouve qu'elle est toujours alcaline à l'alizarine sulfoconjuguée, à l'hélianthine et quelquefois au tournesol. C'est l'acétate de manganèse qui, à ce point de vue possède les propriétés les plus caractéristiques. Sa solution est franchement alcaline, même au papier de tournesol. Lorsqu'on essaie de mesurer cette alcalinité en présence d'un indicateur très sensible, tel que l'alizarine sulfoconjuguée, on s'aperçoit que la neutralisation de cette alcalinité par $\text{SO}^+\text{H}^2 \frac{N}{10}$ est à peu près impossible, car la présence d'un très petit excès d'acétate de manganèse suffit pour maintenir l'alcalinité de la liqueur vis-à-vis de cet indicateur. Il y a un phénomène d'hydrolyse très remarquable, grâce auquel il y a toujours un peu de base libre; cette particularité explique l'activité remarquable de ce sel vis-à-vis de certains polyphénols. Lorsqu'on mesure l'alcalinité des divers sels de manganèse en présence du sulfoconjugué d'alizarine on observe de très grandes différences.

En somme, ce que l'on mesure ainsi n'est pas l'alcalinité dans le sens que l'on attache ordinairement à ce terme, mais la facilité plus ou moins grande que possèdent ces sels en solution de s'hydrolyser ou la quantité d'ions OH disponibles. L'acétate de manganèse en solution produit plus d'ions OH que le formiate ou le sulfate.

Relations entre le degré d'hydrolyse des divers sels de manganèse et le pouvoir correspondant de fixation par ces sels de l'oxygène atmosphérique.

L'expérience suivante montre que l'absorption de l'oxygène par un phénol en présence d'un sel est d'autant plus active que ce sel est plus facilement hydrolysable ou, en d'autres termes, engendre plus d'ions OH.

J'ai fait la mesure du pouvoir hydrolysant à l'aide du sulfoconjugué d'alizarine et celle du pouvoir absorbant à l'aide de l'hydroquinone et de la pyrocatéchine.

Les divers sels de manganèse qui m'ont servi dans ces expériences renfermaient tous 0 gr. 4431 de manganèse métallique dans 100 cc. d'eau.

Mesure du degré d'hydrolyse. — A 5 cc. de chaque solution, j'ajoute goutte à goutte, en présence de l'indicateur, de l'acide sulfurique $\frac{N}{10}$ jusqu'à ce que j'observe un changement de teinte.

Du violet-rouge la couleur doit virer à l'orangé en présence d'alizarine sulfoconjuguée comme indicateur.

	SO_4H^2	$\frac{N}{10}$ ajouté
	Gouttes	
Sulf. de manganèse . . .	0	
Salicylate —	1	virage net
Formiate —	4	—
Lactate —	7	—
Acétate —	40 (?)	vir. diff.
Succinate —	40	—

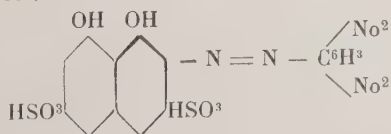
Du bleu la couleur doit virer au rouge en présence du réactif Trillat (1).

	SO_4H^2	$\frac{N}{10}$ ajouté
	Gouttes	
Sulf. de manganèse . . .	0	
Salicylate	0	
Formiate.	2	virage net
Lactate	2	—
Acétate	10	vire peu à peu
Succinate	7	vire difficilement.

Il est évident que ces mesures ne représentent que le degré d'hydrolyse relatif des divers sels ; mais il n'y a que cela qui importe dans ma démonstration.

I. M. TRILLAT a obtenu cet indicateur en diazotant la nitraniline et en copulant le dérivé diazoté avec l'acide dioxynaphtalène-disulfonique symétrique. Le produit obtenu est donc le dinitrobenzène azodioxynaphtalène disulfonique.

Formule développée :



Méthode rapide employée au cours de ces recherches pour la détermination du volume d'oxygène absorbé par mes solutions

Pour mesurer les absorptions d'oxygène, je me sers de cloches à gaz de même capacité et de même diamètre (110 cm³). Elles sont graduées jusqu'à 100 cm³ et peuvent mesurer le demi-centimètre cube. J'introduis dans ces cloches un volume de liquide égal à 20 ou 25 cm³. Comme le volume total d'air emprisonné après bouchage n'est plus que de 80 ou 85 cm³, l'oxygène disponible ne représente que 16 à 17 cm³. Pour réussir mes expériences, il était de toute nécessité de rester au-dessous de cette limite, c'est-à-dire qu'il ne fallait pas que le volume d'oxygène absorbé par mes solutions atteignit ces chiffres.

J'ai tourné la difficulté à l'aide de quelques tâtonnements. Les chiffres fournis par mes expériences en font foi. En effet, le volume d'oxygène absorbé est généralement compris entre 3 et 12 cc.

Mes mesures ont été faites d'après la technique suivante :

J'introduis dans une série de cloches 20 ou 25 cm³ du mélange des corps oxydables et oxydants, et dans un témoin la même quantité du corps oxydable seul. Je ferme hermétiquement ces cloches à l'aide d'un bouchon en caoutchouc que j'enfonce exactement jusqu'à un trait de jauge. J'agite quelques minutes et je dispose mes tubes horizontalement. Au bout d'un temps déterminé, je porte mes cloches sur une cuve à eau et je les débouche sous le liquide en les maintenant à l'aide d'une pince en bois. Il est indispensable avant d'ouvrir le tube de chasser les bulles d'air qui pourraient adhérer aux doigts, au tube ou au bouchon. La lecture se fait après avoir ramené le ménisque du tube à la hauteur de l'eau dans la cuve. Après avoir vidé la cloche, on l'emplit d'une quantité d'eau distillée égale à celle du liquide mis primitivement en expérience et on répète avec l'eau l'opération précédente. La différence de deux lectures donne un volume V. La cloche témoin contenant le phénol seul est traitée comme la précédente et donne un volume V' qui corrige l'effet de la température et de la pression (1) et l'absorption spontanée d'oxygène par le phénol. La différence $V - V'$ donne le volume d'oxygène absorbé.

Au point de vue de la valeur absolue des résultats, ma méthode n'est pas à l'abri de toute critique, mais les chiffres que j'obtiens sont toujours comparables entre eux pour chaque série d'essais. La valeur absolue du volume d'oxygène absorbé n'ajouterait rien à l'intérêt de mes conclusions.

Mesure du pouvoir absorbant

Les absorptions d'oxygène ont été mesurées dans les expériences qui vont suivre avec 20 cc. d'une dissolution d'hydroquinone ou de pyrocaté-

1. Celles-ci changent en effet du jour au lendemain.

chine à 5 o/o additionnée de volumes égaux de solutions des divers sels de manganèse.

Des cloches témoins contenant 20 cc. d'hydroquinone ou de pyrocatechine permettent de faire les corrections nécessaires (changement de pression et de température, oxydation spontanée)

Les tableaux ci-dessus donnent le volume d'oxygène absorbé après 48 heures de contact :

HYDROQUINONE		PYROCATECHINE	
	O absorbé		O absorbé
1 cc. SO^4Mn	4 cc.	5 cc. Salicylate . . .	2 cc. 5
1 cc. Salicylate	3 cc. 5	5 cc. Lactate	2 cc. 5
1 cc. Formiate	3 cc. 5	5 cc. Formiate	2 cc. 2
1 cc. Acétate	6 cc. 5	5 cc. Acétate	5 cc. 5
1 cc. Succinate	6 cc. 5	5 cc. Succinate	5 cc. 65

Cette expérience devient encore plus intéressante si nous ajoutons à la pyrocatechine, en même temps que les sels de manganèse 0 mgr. 1 de fer sous forme de ferrocyanure de fer colloïdal.

PYROCATECHINE			
	O absorbé		O absorbé
	Sans fer		0 mgr. 1 Fe
5 cc. Salicylate . . .	2,5 incolore	4 cc. coloré	} Faible précipité.
5 cc. Lactate. . . .	2,5 —	5 cc. coloré	
5 cc. Formiate	2,2 —	5 cc. coloré	
5 cc. Acétate. . . .	5,5 —	9 cc. très coloré et précipité.	
5 cc. Succinate. . . .	5,65 —	9 cc. —	

Un tube témoin avec de la pyrocatechine et du fer sans sel de manganèse montre que le fer seul ne donne lieu qu'à une faible absorption d'oxygène (1 cc. environ). On verra dans la suite que si l'on réduit la quantité du fer à 0 mgr. 02 l'absorption d'oxygène devient négligeable dans les mêmes conditions.

Ces expériences montrent donc clairement que, non seulement il y a un rapport très étroit entre l'état de dissociation des divers sels et leur capacité oxydante, mais que l'addition d'une trace de ferrocyanure de fer colloïdal peut doubler leur puissance d'oxydation.

Nous voici amené tout naturellement à examiner de plus près les phénomènes d'oxydation que nous avons signalés plus haut, lorsque nous avons fait agir les alcalis, les sels à

réaction faiblement alcaline sur l'hydroquinone en présence de ferrocyanure de fer. Nous laisserons de côté les phénomènes où interviennent les alcalis caustiques et les carbonates alcalins, car ces corps s'éloignent trop par leurs propriétés et leur composition des substances et sels que nous rencontrons dans le règne animal et végétal. Leur étude ne présente qu'un intérêt purement théorique et ce n'est pas là le but que nous poursuivons. Tout en partant de composés bien définis, nous voulons nous rapprocher le plus possible des conditions réalisées dans la nature. J'étudierai par conséquent les sels qui par leur composition, leurs réactions et leurs propriétés présentent le plus d'analogies possibles avec ceux que l'on rencontre dans les sucs végétaux. Parmi ces sels, nous apercevons en première ligne les phosphates.

CHAPITRE V

DE L'INFLUENCE COMPARÉE DES DIVERS SELS DANS LA PRODUCTION DES PHÉNOMÈNES OXYDASIQUES ARTIFICIELS

Ainsi que nous le verrons par la suite, les phosphates ont de nombreuses propriétés communes avec les sels que l'on trouve dans les macérations végétales. Examinons d'abord comment ces phosphates se comportent lorsqu'on les met en présence de polyphénols. Nous avons déjà vu qu'en associant à l'action des diphosphates alcalins (page 35) celle de traces de ferrocyanure de fer, on obtient avec l'hydroquinone des cristaux de quinhydrone. Décomposons donc cette action et faisons agir séparément sur l'hydroquinone le phosphate disodique et le ferrocyanure de fer, puis voyons ce qui arrive quand on combine les deux actions.

Nous nous servons du dispositif décrit plus haut. La solution de phosphate employée renferme 2 gr. 8 de sel cristallisé p. 100. La durée de l'expérience est de 24 heures.

				O. absorbé
1 gr. Hydroquin.	+ 4 cc.	$\text{PO}^4\text{Na}^2\text{H}$ (111) mgr.	5 cc.	Pas de cristaux de quinhydrone
1 gr.	»	+ 4 cc.	» + 0 mgr. 1 Fe.	8 cc. Nombreux crist.
1 gr.	»	+ 0.	» + 0 mgr. 1 Fe.	0 cc. 5

Ainsi nous voyons que le phosphate disodique, lorsqu'il est seul, possède la propriété de fixer l'oxygène moléculaire sur l'hydroquinone ; *il se rapproche donc beaucoup à ce point de vue des sels de manganèse* ; mais il s'en distingue par le fait

de ne pouvoir donner lieu à la formation de cristaux de quinhydrone. On n'obtient ceux-ci que si l'on ajoute au phosphate une faible dose de ferrocyanure de fer. *Nous constatons en outre, et cette propriété est commune avec les sels de manganèse, qu'il y a une absorption d'oxygène plus grande quand on combine l'action du phosphate à celle du fer.* Le ferrocyanure de fer employé seul n'a presque pas d'action (Nous verrons plus tard que cette action peut tomber à 0 lorsqu'on n'emploie que 0 mgr. 02 de fer, en l'absence de tout autre sel).

Comparons maintenant dans des expériences faites en série l'action de l'acétate de manganèse avec celle du phosphate disodique. Parmi le grand nombre d'essais que nous avons effectués pour contrôler nos résultats, nous ne citerons que les plus indispensables (1).

Voici une expérience d'une durée de 24 heures où j'ai comparé l'action de l'acétate de manganèse avec celle du phosphate disodique à différentes températures. J'ai employé des doses équimoléculaires de ces deux sels. Le volume total de la solution = 20 cc.

	O absorbé
1 gr. hydr. + 4 cc. phosph. à 10° C.	5 cc.
1 gr. — + 4 cc. phosph. + 0 mgr. 1 Fe à 10° C.	7,25
1 gr. — + 4 cc. phosph. à 30° C.	6,75
1 gr. — + 4 cc. acét. à 10° C.	6,75
1 gr. — + 4 cc. acét. + 0 mgr. 1 Fe à 10° C.	8,75
1 gr. — + 4 cc. acét. à 30° C.	9,75

Nous voyons que les deux sels se comportent d'une façon analogue. Nous voyons aussi comme on pouvait le prévoir qu'à une température plus élevée l'absorption d'oxygène est plus forte. La chaleur peut donc activer l'oxydation comme le fait le ferrocyanure de fer colloïdal. Nous avons déjà vu que

1. (Il n'est pas inutile de mentionner ici que nous avons soumis les deux sels à de nombreuses cristallisations dans le but de les débarrasser des traces d'alcali libre qu'ils auraient pu contenir. Un fait qui nous semble également intéressant, c'est qu'un flacon d'acétate de manganèse conservé depuis plus d'un an répandait une forte odeur d'acide acétique, tandis que le sel qu'il contenait, et qui sentait également l'acide acétique était entièrement soluble et avait une réaction fortement alcaline).

le phosphate de soude seul ne permet pas d'obtenir de cristaux de quinhdrone, mais que ceux-ci se forment en présence de fer. Nous devons ajouter qu'à la température de 30° il ne se forme de cristaux ni en présence, ni en l'absence de fer. Avec le manganèse il se forme des cristaux de quinhdrone, même en l'absence de fer, si l'on opère à la température de 10 à 15° ; mais l'addition de traces de ferrocyanure peut quadrupler la quantité de quinhdrone. Comme avec le phosphate disodique et le fer, il ne se forme plus de cristaux si l'on opère au-dessus de 30° C. Voici une expérience qui montre les quantités relatives de cristaux qui peuvent se former en opérant dans les mêmes conditions que plus haut.

	Phosphate disodique	Acétate manganeux	Formiate manganeux
Sans fer. . .	0 mgr.	17 mgr.	17 mgr.
Avec fer. . .	49 »	89 »	52 »

Parmi les nombreuses expériences que j'ai faites, je citerai encore celle-ci, où j'ai examiné l'influence de la température sur l'action de divers sels au bout de 48 heures (diphosphate alcalin, acétate de manganèse, acétate de soude, bicarbonate de calcium).

1	O absorbé
1 gr. hyd. + 4 cc. phosph. à 10° C.	7 cc.
1 gr. hyd. + 4 cc. phosph. à 30° C.	10 cc.
2	O absorbé
1 gr. hyd. + 4 cc. ac. de Na à 10° C.	1 cc. 5
1 gr. hyd. + 4 cc. ac. de Na à 30° C.	3 cc. 6
3	O absorbé
1 gr. hyd. + 4 cc. acét. de Mn à 10° C.	10 cc.
1 gr. hyd. + 4 cc. acét. de Mn à 30° C.	13 cc. 7
4	O absorbé
1 gr. hyd. (dans 20 cc. eau du labor.) 10° C. . . .	2 cc. 25
1 gr. hyd. (dans 20 cc. eau du labor.) 30° C. . . .	3 cc. 25
1 gr. hyd. (dans 20 cc. eau du labor.) à 10° + 0 mgr. 1 Fe.	5 cc.

L'expérience 4 est particulièrement intéressante, car elle montre l'influence considérable d'une très faible réaction alcaline dans les phénomènes d'oxydation.

Les 20 cc. d'eau dans lesquels nous avons fait dissoudre 1 gr. d'hydroquinone ne renferment, en effet, que 2 mgr. 9 de carbonate de chaux dissous à la faveur de l'acide carbonique. L'addition de 0 mgr. 1 de Fe à l'état de ferrocyanure double l'absorption d'oxygène. Sans fer, il ne se produit pas de quinhidrone; avec fer, il y en a 40 mgr.

Comparons encore l'action de l'acétate de manganèse avec celle du phosphate disodique vis-à-vis de la pyrocathéchine.

Durée du contact : 24 heures à la température de 15° C.

1 gr. pyroc.	+ 4 cc. phosph. Na.		3 cc. 6
1 gr. »	+ 4 cc. »	+ 0 mgr. 1 Fe.	5 cc 5
1 gr. »	+ 4 cc. acét. Mn		3 cc. 3
1 gr. »	+ 4 cc. »	+ 0 mgr. 1 Fe.	5 cc. 5

On peut dire qu'ici les deux sels se comportent de façon identique. Les deux solutions qui n'ont pas reçu d'addition de ferrocyanure restent incolores, les deux autres se colorent fortement avec formation d'un abondant précipité.

Il résulte des expériences qui précèdent que :

1° *Les sels de manganèse sont d'autant plus actifs qu'ils s'hydrolysent plus facilement, comme l'avait déjà fait remarquer M. G. BERTRAND ;*

2° *Que les diphosphates alcalins se comportent sensiblement comme les sels de manganèse les plus actifs vis-à-vis de l'hydroquinone et de la pyrocathéchine ;*

3° *Que les bicarbonates alcalino-terreux ont des propriétés analogues ;*

4° *Que l'activité des sels de manganèse, des diphosphates alcalins, des bicarbonates alcalino-terreux, se trouve considérablement accrue par l'addition de traces de ferrocyanure de fer.*

Influence d'un acide minéral

Il nous reste encore à examiner l'influence de l'acidité sur le système (sel de Mn + Fe) et (phosph. neutre + Fe). On opère sur 20 cc. pendant 24 heures.

Phosphate disodique + Fe							O absorbé
1 gr. hydr.	+	1 cc. $\text{Po}^4\text{Na}^2\text{H}$ (28 mgr.)	+	0 mgr. 02 Fe.	.	.	5 cc.3
1	»	+	»	»	+	1 mgr. 25 SO^4H^2	4 cc.
1	»	+	»	»	+	2 5 »	1 cc.5

Acétate de manganèse + Fe							O absorbé
1 gr. hydr.	+	1 cc. acét. de Mn (25 mgr.)	+	0 mgr. 02 Fe.	.	.	6 cc.
1	»	+	»	»	+	1 mgr. 25 SO^4H^2	2 cc.4
1	»	+	»	»	+	2 » 5 »	1 cc.

Ces expériences mettent en évidence le rôle *nuisible* des acides. L'activité diminue du fait de la transformation d'une partie du phosphate et de l'acétate en sulfate inactif. Le milieu acide exerce également une action nuisible sur le ferrocyanure de fer. L'acétate de manganèse est plus sensible à l'action de l'acide que le phosphate disodique.

Voilà enfin des expériences qui démontrent que l'on peut abaisser considérablement la dose de ferrocyanure de fer colloïdal sans nuire à l'intensité de la réaction.

24 heures à 18° C°.

O absorbé						
1 gr. hydr.	+	1 cc. ac. Mn.	.	.	.	= 3 cc.5
1	»	+	1	»	.	+ 0,05 Fe = 6 cc.25
1	»	+	1	»	.	+ 0,02 Fe = 6 cc.
1	»	+	0 mgr. 02 Fe	.	.	= 0 cc.
1	»	+	2 cc. phos. disodique.	.	.	= 4 cc.
1	»	+	2	»	+	0,1 Fe = 5 cc.5
1	»	+	2	»	+	0,05 = 5 cc.6
1	»	+	2	»	+	0,02 = 6 cc.
1	»	+	0 mgr. 02 Fe	.	.	= 0 cc.

Influence de doses croissantes de sel sur l'absorption d'oxygène

Il était intéressant d'étudier aussi l'effet sur le phénol de faibles doses croissantes de phosphate neutre, avec et sans colloïde.

Durée de l'expérience : 24 heures.

1 gr. hydr.	+ 5 mgr.6 phosph.		1 cc.3
1 »	+ 5 mgr.6 »	+ 0 mgr. 02 Fe.	2 cc.5
1 »	+ 11 mgr.2 »		2 cc.
1 »	+ 11 mgr.2 »	+ 0 mgr. 02 Fe.	3 cc.8
1 »	+ 16 mgr.8 »		3 cc.
1 »	+ 16 mgr.8 »	+ 0 mgr. 02 Fe.	4 cc.5

Nous voyons par cette expérience qu'avec de faibles doses de phosphate, l'absorption d'oxygène est proportionnelle à la quantité de sel. Les expériences suivantes font voir qu'à partir d'une certaine limite, l'absorption, non seulement ne croît plus proportionnellement à la dose de sel employé, mais qu'elle reste sensiblement stationnaire.

HYDROQUINONE

1 gr. hydr.	+ 2 cc. phosph.	(56 mgr.)	= 4 cc.
1 »	+ 4 »	(112 mgr.)	= 4 cc.5
1 »	+ 6 »	(168 mgr.)	= 5 cc.5

PYROCATHÉCHINE

1 gr. pyr.	+ 2 cc. phosph.	(56 mgr.)	= 3 cc.5
1 »	+ 4 »	(112 mgr.)	= 4 cc.
1 »	+ 6 »	(168 mgr.)	= 4 cc.

Action du phosphate disodique sur le pyrogallol en présence et en l'absence de ferrocyanure de fer

Examinons enfin l'action du phosphate disodique sur le pyrogallol, d'une part, lorsqu'il est seul, et, d'autre part, lorsqu'il est associé au ferrocyanure de fer colloïdal.

Dans les expériences qui vont suivre, nous n'avons pas mesuré la quantité d'oxygène absorbé, mais nous avons pesé la purpurogaline formée.

Nous mettons en présence dans une fiole conique 25 cc. d'une solution de pyrogallol à 0 gr. 5 o/o avec 28 milligr. de phosphate disodique et

0 mgr. 02 de fer sous forme de ferrocyanure de fer colloïdal. Chaque expérience est accompagnée d'un témoin avec la même quantité de pyrogallol et de phosphate, mais sans fer.

La réaction est très énergique, mais ce n'est qu'au bout de 24 heures que l'on obtient des cristaux de purpurogalline; ceux-ci sont faciles à caractériser par la belle coloration bleue qu'ils donnent avec l'ammoniaque.

Pyrogallol en milligr.	Durée de l'expérience en heures	Phosphate disodique en milligr.	Ferrocyanure de fer en milligr.	Poids de purpurogalline en milligr.
125	48	28	0	2
125	48	28	0,02	18,5
125	96	28	0	11,5
125	96	28	0,02	33
125	120	14	0,02	29,5
125	120	28	0,02	38,5

Le volume total du liquide dans ces expériences est de 25 cc. En examinant ces chiffres, on se rend compte tout de suite de l'influence considérable du fer comme catalyseur. Déjà au bout de quelques minutes, on remarque une différence très grande dans l'aspect de ces liqueurs; celles qui contiennent du fer sont d'une teinte plus foncée, qui va sans cesse en s'accroissant.

CHAPITRE VI

ÉTUDE COMPARÉE DES PHOSPHATES ALCALINS, DES CITRATES ALCALINS ET DE L'ACÉTATE DE MANGANÈSE

N'ayant pu réussir à oxyder le gaïacol à l'aide du système acétate de manganèse + ferrocyanure de fer ou du système phosphate disodique + ferrocyanure de fer, j'ai essayé de faire agir à la fois les trois sels, pensant ainsi obtenir une action plus énergique, mais je me suis heurté tout de suite à la difficulté résultant de la précipitation du manganèse à l'état de phosphate. L'idée me vint alors d'essayer l'effet des citrates (MM. EULER et J. BOLIN (47) ont déjà constaté qu'un certain nombre de sels alcalins, chlorures, tartrates, citrates et gluconates possèdent la propriété d'être activés par de faibles doses d'acétate de manganèse, peu actives par elles-mêmes) qui se rapprochent par leur constitution des phosphates. Les acides de ces sels sont en effet tous deux tribasiques. Mais, chose curieuse : en neutralisant ces deux acides par la soude vis-à-vis de divers réactifs colorés, on remarque que le citrate *trisodique* et le phosphate *disodique* sont neutres vis-à-vis de la phtaléine (1) ; en ajoutant à ces sels, en présence d'hélianthine, de l'acide sulfurique, on remarque qu'avec le citrate, il faut deux fois plus d'acide pour arriver à la neutralité à l'hélianthine qu'avec le phosphate (2) (pour des quantités équimoléculaires). Cette neutralité correspond donc pour les deux

1. G. BERTHARD a constaté le même fait.

2. Avec le citrate le virage n'est pas très net.

composés aux sels acides (1). Si l'on mesure l'alcalinité des deux sels neutres à la phtaléine à l'aide d'un réactif beaucoup plus sensible, tel que l'alizarine sulfoconjuguée, on constate que le phosphate disodique possède une alcalinité plus forte que le citrate trisodique. On peut expliquer dès lors pourquoi le phosphate disodique possède une activité spécifique plus considérable que le citrate trisodique dans les phénomènes d'oxydation et d'activation que nous aurons l'occasion d'étudier plus loin.

Sur l'hydrolyse de divers sels

Nous avons déjà vu à propos des sels de manganèse qu'il y a une relation étroite entre l'hydrolyse de ces sels et la fixation par ces mêmes sels de l'oxygène atmosphérique. Nous avons mesuré cette tendance plus ou moins accentuée à l'hydrolyse par l'addition de $\frac{\text{SO}_3\text{H}^2}{10}$ en présence du sulfoconjugué d'alizarine comme indicateur. Si nous répétons la même expérience avec divers sels, nous remarquons que les *citrates tribasiques* se comportent sensiblement comme l'*acétate de manganèse*, tandis que les *phosphates bibasiques* ont une tendance à l'hydrolyse *beaucoup plus marquée*. Et cependant, de ces trois sels, c'est l'acétate qui se montre le plus actif dans la fixation de l'oxygène atmosphérique sur l'hydroquinone; puis viennent par ordre décroissant le phosphate bibasique, puis le citrate tribasique. Cet exemple nous montre *que si l'on doit attacher une certaine importance à la relation qui existe entre l'hydrolyse d'un sel et sa propriété de fixer l'oxygène, il y a encore d'autres facteurs importants qui interviennent et qu'il ne faut pas tout faire dépendre de l'hydrolyse.*

1. Les expériences ont été faites à l'aide de solutions très diluées de ces sels.

Voici un exemple qui nous montre comment des doses équimoléculaires de ces trois sels se comportent vis-à-vis de l'hydroquinone. Le volume total du liquide est de 20 cc. La durée de l'expérience est de 24 heures :

	O absorbé
1 gr. hydr. + 2 cc. Acétate de Mn. . . .	5 cc. 6
1 gr. hydr. + 2 cc. $\text{PO}^4\text{Na}^2\text{H}$	4 cc. 3
1 gr. hydr. + 2 cc. $\text{C}^6\text{H}^5\text{O}^7\text{Na}^3$	3 cc. 3

Voyons encore quelle est l'action de ces divers sels si on les couple à des traces de ferrocyanure de fer :

Avec l'hydroquinone (1 gr. dans 20 cc.)

0 gr. 02 Fe	0 cc.	0 mgr. 02 Fe. . . .	0 cc.
2 cm ³ Mn ($\text{C}^2\text{H}^3\text{O}^2$) ²	5 cc. 5	2 cm ³ $\text{PO}^4\text{Na}^2\text{H}$	4 cc.
Fe + Mn ($\text{C}^2\text{H}^3\text{O}^2$) ²	7 cc. 5	Fe + $\text{PO}^4\text{Na}^2\text{H}$	6 cc.
0 mgr. 02 Fe.	0 cc.		
2 cm ³ ($\text{C}^6\text{H}^5\text{O}^7$) Na ³	3 cc.		
Fe + $\text{C}^6\text{H}^5\text{O}^7\text{Na}^3$	3 cc.		

Avec la pyrocatechine (1 gr. dans 20 cc)

0 mgr. 05 Fe	0 cc. 2		
4 cm ³ Mn ($\text{C}^2\text{H}^3\text{O}^2$) ²	3 cc 5 incolore		
Fe + Mn ($\text{C}^2\text{H}^3\text{O}^2$) ²	6 cc. color. + précipité		
0 mgr. 05 Fe	0 cc. 2		
4 cc. $\text{PO}^4\text{Na}^2\text{H}$	3 cc. 5 incolore		
Fe + $\text{PO}^4\text{Na}^2\text{H}$	5 cc. 8 color. + précipité		
0 mgr. 05 Fe	0 cc.		
4 cc. $\text{C}^6\text{H}^5\text{O}^7\text{Na}^3$	3 cc. incolore		
Fe + $\text{C}^6\text{H}^5\text{O}^7\text{Na}^3$	6 cc. color. + précipité		

Ces expériences démontrent que le fer active l'oxydation de l'hydroquinone par l'acétate de manganèse et le phosphate disodique, ce que nous savions déjà ; *mais elles font voir aussi que le citrate trisodique n'est pas activé par le fer vis-à-vis de l'hydroquinone. Ce fait est à retenir !*

Si nous jetons un coup d'œil sur ce qui se passe avec la pyrocatechine, nous constatons que l'activité des trois sels est considérablement accrue par le fer et que le couple (citrate-fer) montre une énergie oxydante un peu plus grande que les

deux autres couples ; ou mieux que le fer, dans ce cas est plus activant ou activé.

De ces expériences retenons surtout ceci : dans le couple citrate + Fe, le fer est actif vis-à-vis de la pyrocatechine et inactif vis-à-vis de l'hydroquinone.

En présence de ces faits, je me suis demandé si en couplant un autre métal que le fer au citrate, on n'obtiendrait pas un résultat positif avec l'hydroquinone ?

Ayant à ma disposition des solutions dosées de sels de manganèse, ma première idée fut d'essayer l'un de ces sels : l'acétate par exemple. Ma tentative réussit, car le couple « citrate + manganèse » s'est montré plus énergique que les couples « acétate de Mn + fer » et « phosphate disodique + fer ». Comme l'acétate de manganèse oxyde déjà par lui-même l'hydroquinone, il fallait voir si en employant une dose suffisamment petite de ce sel il n'agirait plus à lui tout seul. J'ai trouvé qu'une dose correspondant à 0 mgr. 5 de manganèse pouvait remplir parfaitement ces conditions. Voici une expérience très complète où j'ai envisagé plusieurs combinaisons :

1	gr. hyd.	dans 20 cc. d'eau	Témoin	1 cc. 1
1	—	—	+ 0 mgr. 5 Mn.	1 cc. 3
1	—	—	+ 0 mgr. 5 Mn + 0 mgr. 02 Fe.	2 cc.
1	—	—	+ 2 cc. citrate	2 cc 8
1	—	—	+ 2 cc. citrate + 0,5 Mn.	6 cc.
			Quinhydr. néant	
1	—	—	+ 2 cc. citrate + 0,5 Mn + 0,02 Fe.	7 cc. 6
			Quinhydr.	

Il ressort de ces chiffres que des doses d'acétate de manganèse (0 mgr 5 Mn) inactives par elles-mêmes peuvent doubler l'activité du citrate trisodique et que, dans ces conditions le fer peut encore exalter l'activité du système.

J'ai répété la même expérience avec 0 mgr. 5 de manganèse à l'état de sulfate et j'ai obtenu des résultats semblables.

Je me suis alors proposé de rechercher si le manganèse à cette dose aurait une influence analogue vis-à-vis du citrate et de la pyrocatechine, et j'ai fait l'expérience suivante :

1 gr. pyroc	dans 20 cc. d'eau	Témoin	0 cc.7	Corrigé
1	—	+ 0 mgr. 02 Fe.	0 cc.7	= 0
1	—	+ 0 mgr. 02 Fe + 2 cc. citrate.	7 cc 4	= 6,7
1	—	+ 4 cc. citrate	4 cc.	= 3,3
1	—	+ 4 cc. citrate + 0 mgr. 5 Mn (à l'état de sulfate)	4 cc.	= 3,3
1	—	+ 4 cc citrate + 0 mgr. 5 Mn + 0 mgr. 02 Fe.	7 cc.1	= 6.4

**Sur la spécificité du fer et du manganèse dans leur action
combinée avec le citrate trisodique**

Il résulte clairement des chiffres précédents que si le fer a une influence considérable dans l'oxydation de la pyrocatechine en présence du citrate, le manganèse n'en a aucune si on l'emploie à l'état de sulfate et à dose minime (1). Si nous mettons les chiffres les plus saillants de la dernière expérience en regard de ceux de l'expérience précédente, nous aurons ceci :

HYDROQUINONE		O absorbé
0 mgr. 5 Mn		0 cc.
2 cc. $C^6H^5O^7Na^3$		2 cc.8
0 mgr. 5 Mn + 2 cc. $C^6H^5O^7Na^3$		6 cc.
0 mgr. 02 Fe + $C^6H^5O^7Na^3$		2 cc.8

PYROCATÉCHINE		O absorbé
0 mgr. 02 Fe		0 cc.
4 cc. $C^6H^5O^7Na^3$		3 cc.3
0 mgr. 02 Fe + 4 cc. $C^6H^5O^7Na^3$		6 cc.7
0 mgr. 5 Mn (sulfate) + 4 cc. $C^6H^5O^7Na^3$		3 cc 3

Le fait capital qui se dégage de ces expériences c'est que lorsqu'il est associé au citrate trisodique le manganèse est

1. Si on emploie une quantité équivalente de Mn à l'état d'acétate, on observe une faible oxydation. Ces faits ressortent d'expériences publiées en commun avec M. de STOECKLIN, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXIII, p. 851, 1909.

actif vis-à-vis de l'hydroquinone et inactif vis-à-vis de la pyrocatechine, et inversement, le fer lorsqu'il est associé au citrate est actif vis-à-vis de la pyrocatechine et inactif vis-à-vis de l'hydroquinone. Il n'est pas inutile de rappeler que le fer et le manganèse sont employés ici à doses infinitésimales, et qu'ils agissent comme catalyseurs.

Autres exemples d'actions spécifiques artificielles

Ce résultat déjà fort intéressant par lui-même acquiert une importance encore plus grande si nous le rapprochons des expériences suivantes, où j'ai constaté que la formation de quinhydrone, de purpurogalline, de tétragaïacoquinone est sous la dépendance d'associations de sels bien déterminés dont les uns ont pour effet de fixer l'oxygène atmosphérique sur les phénols et les autres de renforcer cette action et de produire des oxydations d'un caractère spécifique bien marqué. Ainsi, les citrates neutres, les diphosphates alcalins, les bicarbonates alcalino-terreux peuvent oxyder l'hydroquinone, mais sans donner de cristaux de quinhydrone. L'addition de faibles doses de ferrocyanure de fer colloïdal aux deux derniers sels donne lieu à la formation de tels cristaux. Si l'on ajoute les mêmes doses de ferrocyanure aux citrates tribasiques, on n'obtient pas de quinhydrone. Le mécanisme de l'oxydation varie donc d'un sel à l'autre. De même les diphosphates alcalins et les citrates tribasiques qui sont capables d'oxyder le pyrogallol (voir à la page 47 les dosages de purpurogalline) ne fournissent au bout de 24 ou de 48 heures que des traces de purpurogalline. La présence de doses infimes de ferrocyanure donne lieu, dans les mêmes conditions, à la formation de grandes quantités de purpurogalline. Si dans ces expériences on remplace le fer par le manganèse, même à dose massive, on ne constate aucun progrès.

Sur l'oxydation du gaïacol

Le gaïacol nous fournit un exemple curieux de l'influence que peut exercer l'action combinée de diverses substances sur un substratum difficilement oxydable par l'oxygène atmosphérique. En effet, si l'on soumet un composé phénolique tel que le gaïacol séparément à l'action d'un citrate alcalin, d'un sel de manganèse, du ferrocyanure de fer, de la quinhydrone, on n'observe pas de fixation d'oxygène sur le phénol. Le gaïacol se montre également réfractaire au couplage de deux quelconques de ces substances. Il n'en va plus de même si à l'action combinée du citrate trisodique et du sulfate de manganèse, on ajoute celle du ferrocyanure de fer qui joue ici le rôle d'intermédiaire entre les sels et le phénol. Si l'on remplace le ferrocyanure de fer par une trace de quinhydrone, on observe également une oxydation du gaïacol, mais les produits d'oxydation ne sont plus les mêmes. En faisant agir sur le gaïacol les quatre substances à la fois, on est témoin d'une oxydation beaucoup plus active et il y a formation de tétragaïaquinone. On hâte le départ de la réaction en amorçant celle-ci par un court chauffage vers 60° et en la laissant se poursuivre à la température ordinaire. Au bout de vingt heures, elle est déjà très avancée. Si, *conservant les trois autres substances, on remplace le ferrocyanure de fer par la peroxydiastase du malt, on constate également la formation de tétragaïaquinone.*

Les traces de quinhydrone jouent ici, soit vis-à-vis du ferrocyanure de fer, soit vis-à-vis de la peroxydiastase du malt, le rôle d'un peroxyde instable. L'ensemble de ce système à quatre éléments fonctionne comme celui que BACH et CHODAT ont imaginé pour expliquer le mécanisme des oxydases. D'après ceux-ci, il y aurait : 1° Fixation de l'oxygène atmosphérique par une diastase sur un corps facilement oxydable, mais très instable,

2° Transport de l'oxygène du composé instable sur le corps à oxyder par l'intermédiaire de la peroxydase.

Dans notre système artificiel que voyons-nous ?

1° Fixation de l'oxygène par l'influence combinée du citrate et du sel de manganèse sur la quinhidrone.

2° Transport de l'oxygène de la quinhidrone ou d'un de ses produits d'oxydation instables sur le gaïacol par l'intermédiaire du ferrocyanure de fer ou de la peroxydase du malt.

Le tableau suivant permet de saisir le phénomène dans son ensemble.

Dans les essais ci-dessous, j'ai employé 20 cc. d'une solution de gaïacol à 1,5 p. 100.

Citrate à 2,5 p. 100	Sulfate de Mn	Ferrocyanure de fer	Quinhidrone	Produits d'oxydation du gaïacol
1 cc.	0	0 mgr. 04 Fe	0 mgr. 2	0
0 cc.	0 mgr. 5 Mn	0 mgr. 04 Fe	0 mgr. 2	0
1 cc.	0 mgr. 5 Mn	0	0 mgr. 2	Peu coloré
1 cc.	0 mgr. 5 Mn	0 mgr. 04 Fe	0	Faible précipité lie de vin
1 cc.	0 mgr. 5 Mn	0 mgr. 04 Fe	0 mgr. 2	Abond. »
1 cc.	0 mgr. 5 Mn	peroxyd. du malt	0 mgr. 2	Précipité »

Malgré la grande analogie de ces produits d'oxydation avec ceux que la laccase fournit avec le gaïacol, l'enzyme agit d'une façon beaucoup plus énergique sur ce phénol que le système artificiel.

Quoi qu'il en soit, les phénomènes que nous venons d'analyser présentent dans leur ensemble une analogie frappante avec certains phénomènes d'oxydation provoqués par la laccase.

Il résulte en outre des nombreuses expériences que nous venons de citer que le fer apparaît dans tous les cas comme un catalyseur de premier ordre. Même lorsque le fer couplé à un sel alcalin ne produit rien, il suffit d'aider son action par l'adjonction de traces d'un sel de manganèse.

Les analogies que je viens de viser avec l'action de la laccase m'ont conduit tout naturellement à étudier quelques réactions oxydasiques nouvelles provoquées par le suc de *Russula delica* dans lequel la présence de la laccase et de la tyrosinase a été signalée par G. BERTRAND.

TROISIÈME PARTIE

CHAPITRE VII

SUR QUELQUES PROPRIÉTÉS NOUVELLES DES OXYDASES DE *RUSSULA DELICA*. IMPORTANCE DE LA RÉACTION DU MILIEU

L'influence favorable ou nuisible que peut exercer dans les actions diastasiques la réaction du milieu est une notion déjà ancienne dans l'histoire des diastases ; elle a été bien mise en évidence par les travaux de KJELDAHL (48), FERNBACH (49), MAQUENNE et ROUX (50), BERTRAND (51). J'ai apporté moi-même ma contribution à cette étude par ma collaboration avec M. FERNBACH (52), et j'ai acquis depuis la certitude que de très petites différences de réaction, insoupçonnées jusqu'ici, peuvent avoir une influence capitale dans l'apparition ou l'absence d'un grand nombre de phénomènes diastasiques. D'autre part, mon étude précédente relative au rôle que peuvent jouer certains sels à réaction faiblement alcaline, associés à des doses infimes de ferrocyanure de fer colloïdal ou à des traces d'un sel de manganèse dans l'oxydation de quelques composés phénoliques montre toute l'importance de cette influence du milieu.

Cette considération m'a conduit à examiner au point de vue de leur réaction quelques macérations d'oxydases et particulièrement des extraits glycéринés de *Russula delica*, que

MM. CH. GESSARD et BERTHELOT ont bien voulu mettre à ma disposition. J'ai constaté que ces extraits ont, vis-à-vis de la tyrosine et d'un grand nombre de réactifs nouveaux des oxydases que je viens de découvrir, leur maximum d'activité pour une réaction voisine de la neutralité à la phtaléine et que le phosphate disodique à faible dose favorise beaucoup ces réactions. Lorsqu'on s'éloigne de cette neutralité, soit dans un sens, soit dans l'autre, par addition d'alcali ou d'acide sulfurique, ces réactions se produisent plus difficilement; elles sont retardées par un petit excès de soude et empêchées dans le cas d'addition d'acide. En résumé, la réaction la plus favorable pour toutes ces oxydations nouvelles est la même que celle que nous avons constatée dans le chapitre précédent au cours de notre étude sur les phénomènes oxydasiques artificiels. En effet, nous avons vu que ce sont les diphosphates alcalins, le citrate trisodique, l'acétate de manganèse (1), tous sels dont la réaction est franchement alcaline vis-à-vis d'un grand nombre de réactifs et, en particulier, du sulfoconjugué d'alizarine, qui favorisent le plus l'oxydation de l'hydroquinone, de la pyrocatéchine, du pyrogallol et du gaïacol. Pour apprécier la réaction des extraits glycerinés de champignon, je me suis servi de divers réactifs colorés, parmi lesquels se place au premier rang l'alizarine sulfoconjuguée qui, grâce à son extrême sensibilité aux ions OH permet d'apprécier des différences de réaction extrêmement faibles, différences qui échappent aux autres réactifs généralement employés. La cochenille est d'ailleurs également un réactif d'une très grande sensibilité vis-à-vis des ions OH. J'ai pu constater grâce à ces réactifs très sensibles pour l'alcalinité une propriété nouvelle des oxydases de la Russule : celle d'oxyder les matières colorantes sus-nommées lorsque la réaction du milieu est voisine de l'alca-

1. L'acétate de manganèse, il est vrai, se montre en général peu actif dans les réactions que nous allons étudier; mais ce sel, ainsi que nous l'ont appris les expériences de M. G. BERTRAND, rend actif l'extrait de luzerne, inactif par lui-même.

linité à la phtaléine. La quantité de soude ou d'ammoniaque qu'il faut ajouter pour réaliser les conditions optima varie avec la substance que l'on soumet à l'oxydation. Nous donnons au cours de ce chapitre plus de détails à ce sujet. M. Bourquelot a déjà signalé des phénomènes oxydasiques naturels qui s'accomodent mieux d'un milieu faiblement alcalin. J'ai vu de mon côté que certains sels à réaction faiblement alcaline, tels que les diphosphates alcalins ou les citrates tribasiques favorisent beaucoup certaines oxydations. Il n'est pas douteux que d'autres sels à base alcaline ou alcalino-terreuse soient capables de produire des effets semblables (1).

J'ai essayé d'oxyder avec le suc de *Russula delica* l'orcine et quelques matières colorantes, et j'ai constaté que les propriétés oxydantes de ce suc peuvent s'étendre à un grand nombre de ces substances. Je citerai parmi celles-ci, à côté de l'alizarine sulfoconjuguée et de l'orcine tous les dérivés solubles d'alizarine, la cochenille, l'hématoxyline, le bleu de quinoline, l'orangé I Poirrier et un certain nombre de matières colorantes présentes dans les fleurs les plus communes, telles que : violettes, iris, roses, œillets rouges, giroflées, etc. L'orangé II Poirrier (isomère de l'orangé I Poirrier) la fuchsine et ses dérivés, l'hélianthine ne s'oxydent pas en milieu neutre ou alcalin.

Quelques-unes de ces oxydations peuvent également être

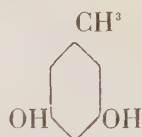
1. C'est ici le moment d'ouvrir une parenthèse pour signaler qu'il existe des cas où le milieu alcalin n'est pas favorable à l'oxydation. En effet, j'ai observé que certaines substances comme, par exemple, l'hélianthine, ne peuvent s'oxyder par l'extrait de *Russula delica* que si le milieu est faiblement acide. L'acidité qui convient le mieux dans ce cas est celle que produit l'addition d'un phosphate acide (Les oxydations qui exigent pour se manifester un tel milieu se font avec une très grande lenteur). Je me réserve de revenir sur cette question et de la traiter plus à fond dans un mémoire ultérieur.

Je ne développerai dans la suite que ce qui a trait à l'oxydation en milieu neutre ou alcalin pour ne pas sortir du cadre que je me suis tracé.

Il faut entendre ici par milieu neutre le milieu naturel.

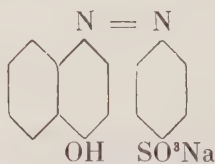
obtenues avec la laccase de l'arbre à laque (1) qui oxyde avec la même facilité que l'extrait de Russule la teinture fraîche de gaïac, l'hématoxyline et le bleu de quinoline ; mais il y a d'autres substances que la laccase de l'arbre à laque oxyde difficilement, comme l'orangé I et l'orcine (et ce dernier phénol en milieu alcalin seulement). Enfin, la laccase oxyde à peine, ou pas du tout, les combinaisons solubles d'alizarine, la cochenille et certaines matières colorantes des fleurs.

L'oxydation énergique de l'orcine par l'extrait de Russule, sujet sur lequel je reviendrai plus tard, me paraît un fait très digne de remarque. En effet, la constitution de ce phénol ne paraissait pas devoir se prêter facilement à l'action oxydante de la laccase à cause de la position relative des deux hydroxyles dans le noyau benzénique (les deux hydroxyles en méta).

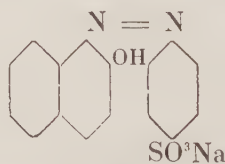


L'expérience dans ce cas serait donc en contradiction avec la loi d'oxydabilité des phénols, telle que l'a formulée M. G. BERTRAND ? Nous verrons plus loin quelle interprétation il convient de donner à ces faits en apparence contradictoires.

D'autre part, un exemple nouveau du rôle que peut jouer chez des corps isomères, la position relative des groupements latéraux dans le noyau benzénique (au point de vue de leur attaque par les diastases) nous est fourni par les orangés I et II.



Orangé I = α Naphtolazobenzène
sulfonate de sodium



Orangé II = β Naphtolazobenzène
sulfonate de sodium

1. La comparaison entre la laccase de l'arbre à laque et l'oxydase du suc de Russule a été faite avec des solutions équivalentes au point de vue de leur activité oxydante vis-à-vis de l'hydroquinone.

En effet, l'orangé I est attaqué avec énergie par l'oxydase de l'extrait de Russule et l'orangé II est insensible à cette influence.

Expériences sur la cochenille

Citons enfin une expérience curieuse qui consiste à diviser en deux portions égales une solution de cochenille décolorée par l'oxydase et à faire bouillir l'une qui, de ce fait, reprend sa couleur primitive. L'addition à froid dans les deux portions d'une solution neutre d'acétate d'urane détermine dans la cochenille régénérée la formation d'une belle laque verte. Le même réactif ne produit rien avec la portion non régénérée.

Pour réussir cette expérience, il ne faut pas laisser l'oxydation se poursuivre trop longtemps, autrement elle irait trop loin et il ne serait plus possible de régénérer la cochenille. A quoi est due cette régénération de la cochenille ? Est-ce à la décomposition d'un produit oxygéné instable à la température de l'ébullition, est-ce à la présence d'un produit réducteur dans la macération ? Je n'ai pas poussé plus loin mes recherches dans cette direction ; mais, de l'avis de M. G. BERTRAND, il s'agirait bien en l'espèce d'une action réductrice.

Avant de pousser plus loin nos recherches, nous avons soumis nos solutions colorées à l'action de la macération oxydante à l'abri du contact de l'air. Le mélange est introduit vivement dans des ampoules en verre où l'on fait rapidement le vide. Les solutions colorées se conservent ainsi indéfiniment. Des témoins préparés en même temps se décolorent en quelques minutes à l'air. Il demeure donc bien établi que c'est l'oxygène de l'air qui intervient dans ces phénomènes de décoloration.

D'autre part, je me suis assuré que l'extrait de Russule chauffé 1/4 d'heure à 65-70° n'oxyde plus la tyrosine (G. BERTRAND) mais conserve les propriétés indiquées plus haut, ce qui exclut l'intervention de la tyrosinase.

J'ai essayé de séparer par un chauffage graduel à des températures de plus en plus élevées la laccase de l'oxydase nou-

velle, dont je pouvais à bon droit soupçonner l'existence dans la macération de Russule, mais sans résultat. On ne peut arriver à séparer par la chaleur les propriétés bien connues de la laccase des propriétés nouvelles que je viens de signaler. J'ai cru longtemps que les différences observées étaient du même ordre que celles que l'on constate entre l'amylase de l'orge ou du froment et du malt (53, 54), ou entre les maltases de diverses origines (55, 56, 57). Mais une expérimentation plus rigoureuse m'a démontré dans la suite qu'il y a lieu de donner à ces phénomènes une interprétation un peu différente : car, outre que l'on a affaire ici, comme pour l'orge germée, à un enzyme plus énergique, il se produit encore une exaltation de l'activité diastasique grâce à l'intervention de certains sels.

CHAPITRE VIII

EXPÉRIENCES DESTINÉES A DÉTERMINER LA RÉACTION OPTIMA
DANS L'OXYDATION PAR LE SUC DE RUSSULE, DE L'ORCINE ET DE
DIVERSES MATIÈRES COLORANTES : ALIZARINE SULFOCONJUGUÉE,
COCHENILLE, HÉMATOXYLINE. ACTION DES ACIDES ET DES BASES.

J'examinerai successivement : 1° Comment les substances énumérées ci-dessus se comportent vis-à-vis de l'extrait de Russule pour les réactions de cet extrait comprises entre la neutralité à l'hélianthine et la neutralité à la phtaléine, par des additions graduelles de $\text{SO}^4\text{H}^2 \frac{\text{N}}{10}$ ou de $\text{NaOH} \frac{\text{N}}{10}$.

2° Comment elles se comportent vis-à-vis de NaOH libre.

3° Comment elles se comportent vis-à-vis de SO^4H^2 libre.

Observations importantes

Quoique fort simples en apparence, ces expériences sont d'une exécution très délicate et demandent de nombreux tâtonnements préliminaires. En effet, les proportions relatives de matière colorante et d'enzyme qu'il faut mettre en œuvre varient avec l'activité de ce dernier facteur. Il est évident que si l'on expérimente à l'aide d'une macération relativement récente de *Russula delica*, il faut pour obtenir de bons résultats attaquer une dose de matière colorante beaucoup plus considérable que si l'on emploie une macération de

champignons déjà ancienne. D'autre part, si l'on se propose d'étudier l'action des acides et des bases sur l'enzyme, la macération ancienne offre des avantages incontestables sur la première par la proportion beaucoup plus considérable de sels qu'elle renferme. Comme ces sels exercent sur l'activité de l'enzyme une influence très grande, il est du plus haut intérêt de s'adresser à une macération où le contact des champignons avec la glycérine a été d'une certaine durée (trois semaines à un mois).

L'étude d'une telle macération est très instructive, car elle montre le rôle activant ou paralysant que peuvent jouer sur l'enzyme certains sels normalement contenus dans les tissus de la plante.

Comme nous le démontrerons dans la suite, il suffit d'un changement de réaction, en apparence insignifiant, pour rendre ces sels actifs ou inactifs (1). Ces changements de réaction sont si faibles qu'ils ne sont pas sensibles aux réactifs ordinairement employés et qu'ils ont toujours échappé jusqu'ici aux expérimentateurs; on ne peut les déceler qu'à l'aide de réactifs appropriés, tels que l'alizarine sulfoconjuguée et la cochenille. Ces matières colorantes permettent, en effet, d'apprécier des différences de réaction jusqu'ici insoupçonnées.

J'ai signalé il y a plus d'un an l'extrême sensibilité de l'alizarine sulfoconjuguée à propos de l'alcalinité des sels de manganèse. Depuis, M. AGULHON s'est servi du même réactif dans son étude sur l'acide borique (58).

Partie expérimentale

Essais préliminaires : On détermine d'abord quelle est, pour un volume donné de macération, la quantité de NaOH $\frac{\text{N}}{10}$ et de So^4H^2 $\frac{\text{N}}{10}$ nécessaire

1. Voir aussi G. BERTRAND, *loc. cit.* (59) qui a montré que la laccase était influencée par des quantités d'acide si petites qu'on ne pouvait les déceler par aucun réactif chimique, mais seulement par la réaction diastatique elle-même.

pour atteindre : 1° la neutralité approchée à la phthaléine ; 2° la neutralité vis-à-vis de l'hélianthine (1). Exemple : en opérant sur 1 cc. de macération, il faut 3 gouttes de $\text{NaOH} \frac{N}{10}$ pour atteindre la neutralité de la phthaléine et 5 gouttes de $\text{SO}^4\text{H}^2 \frac{N}{10}$ pour atteindre la neutralité à l'hélianthine. Une macération plus concentrée a demandé 4 gouttes de $\text{NaOH} \frac{N}{10}$ dans le premier cas et 11 gouttes de $\text{SO}^4\text{H}^2 \frac{N}{10}$ dans le second. Ces mesures font voir qu'il y a dans la macération plus de sels alcalins que de sels acides.

L'expérience suivante rend compte de l'extrême sensibilité de réactifs tels que : l'alizarine sulfoconjugué ou la cochenille.

Dans une série de tubes contenant chacun 1 cc. de macération de Russule, on ajoute d'une part des doses croissantes de soude ; d'autre part, des doses croissantes d'acide, puis après avoir amené le contenu des tubes à 3 cc. on prélève 5 gouttes dans chacun d'eux et on les étend à 1 cc. avec de l'eau distillée. On ajoute alors dans chacun des tubes de la nouvelle série quelques gouttes de réactif et on constate entre la réaction qui correspond à la neutralité à l'orangé et celle qui correspond à la neutralité à la phthaléine une véritable gamme de teintes variant du violet foncé au jaune clair en passant par une foule de nuances intermédiaires. Ces matières colorantes (2) sont donc des réactifs d'une sensibilité extraordinaire, que l'on peut comparer en quelque sorte à l'enzyme pour leur sensibilité à la réaction du milieu : A chacune des nuances précitées correspond une autre réaction à laquelle l'oxydase est très sensible. Pour bien observer ces phénomènes, il est nécessaire de se placer dans de bonnes conditions, et pour bien réaliser ces conditions, il faut opérer comme nous l'indiquons ci-dessous.

Détermination de la réaction optima (3)

Première dilution A. — D'une part, dans une série de tubes (divisés en deux groupes) renfermant chacun 1 cc. de macération, on ajoute à l'aide

1. Lorsqu'on prend la neutralité vis-à-vis de l'hélianthine, il est indispensable d'opérer en présence d'une liqueur témoin renfermant la même quantité d'hélianthine. On s'aperçoit que la neutralité est atteinte dès qu'on constate une différence de teinte entre la liqueur que l'on titre et le témoin.

2. L'alizarine et la cochenille.

3. Les macérations aqueuses ou glycerinées fraîchement préparées ne se prêtent pas à ces expériences parce qu'elles ne renferment pas assez de sels.

d'un compte-gouttes 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 (1) gouttes de $\text{SO}^4\text{H}^2 \frac{\text{N}}{10}$
(groupe α) et 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 gouttes de $\text{NaOH} \frac{\text{N}}{10}$ (groupe β).

Entre le groupe α et le groupe β , on place un tube témoin avec 1 cc. de macération naturelle; enfin on amène le liquide de tous les tubes au même volume, soit en tout 3 cc. Le tube 5 du groupe α correspond à la neutralité à l'hélianthine et le tube 3 du groupe β correspond à la neutralité à la phthaléine.

Deuxième dilution B. — D'autre part, je dispose en face du support garni des tubes précédents un autre support garni d'une nouvelle série de tubes divisés également en deux groupes α' et β' (nous désignerons ces tubes par 1', 2', 3', 4', 5', etc.). Je verse dans chacun des tubes de la série B, à l'aide d'un compte-gouttes, 5 gouttes prélevées dans chacun des tubes correspondants de la série A, puis j'ajoute dans chaque tube 1 cc. 5 d'eau distillée et 2 gouttes d'une solution d'alizarine sulfoconjuguée. On observe alors la vitesse de décoloration dans chaque tube. Il est évident dès lors que la réaction optima correspond au tube qui se décolore le premier. Dans le cas présent, ce sont les tubes 1', 2', 3', contenant des doses croissantes de NaOH qui se décolorent les premiers, mais avec des vitesses différentes. L'optimum correspond au tube 3' qui se décolore le plus rapidement (2); puis viennent par ordre décroissant les tubes de 2' et 1'.

L'addition de soude normale dans ces trois tubes ne fait plus réapparaître la teinte violette caractéristique, ce qui indique que la matière colorante a été détruite par oxydation. A ce moment le tube ayant reçu la macération naturelle (tube témoin) se colore encore par addition de NaOH et les tubes qui renferment la macération contenant des doses croissantes d'acide et qui, par ce fait, étaient devenues jaunes, se recolorent d'une façon intense par addition d'alcali.

Le fait que des traces d'acide minéral, insuffisantes pour exister à l'état libre dans le milieu actif, grâce à la présence d'un excès de sels à acides organiques, gênent considérablement le phénomène d'oxydation, démontre l'influence favorisante des sels de la macération alcalins à l'hélianthine. Comme, d'autre part, le tube témoin dont la réaction n'a pas été modifiée se recoloré fortement par la soude, il faut en conclure que la réaction naturelle du milieu n'est pas la plus favorable à l'oxydation. Quant aux tubes 4', 5', 6' du groupe β' qui renferment un excès de soude, ils se décolorent encore assez rapidement. On se rend compte aisément par cet exemple qu'un peu d'alcali libre entrave infiniment moins la réaction que la disparition provoquée par SO^4H^2 d'une partie des sels alcalins, à l'hélianthine. Ainsi, dans le tube 10' du groupe β' , la réaction est bien retardée, mais elle progresse encore avec une certaine rapidité.

1. C'est-à-dire que dans le premier tube on ajoute 2 gouttes, dans le deuxième, 3 gouttes, dans le troisième, 4 gouttes, etc.

2. L'optimum se confond ici avec la neutralité à la phthaléine.

Avec l'acide les choses se passent tout différemment. Nous avons vu que le tube 10' du groupe α' a été préparé avec 5 gouttes du tube 10 du groupe α . Or, le tube 10 renferme 5 gouttes de $\text{SO}^4\text{H}^2 \frac{\text{N}}{10}$ libre, c'est-à-dire en sus de ce qu'il faut pour la neutralité à l'hélianthine, ce qui représente 1 mgr. 22 de SO^4H^2 ; le tube 10' du groupe α' renfermera donc 0 mgr. 1 de SO^4H^2 libre. Si au bout de 24 heures on examine ce qu'est devenue la réaction on constate qu'elle n'est même pas commencée.

C'est avec la cochenille comme réactif que l'on suit le mieux les différentes phases de la réaction oxydante. En effet, si, procédant comme pour l'alizarine, on attend que les tubes du groupe β' : 1', 2', 3', 4', 5' soient décolorés et que l'on ajoute à ce moment un excès d'alcali dans tous les tubes, on voit par la dégradation progressive des teintes que l'action de l'acide dans le groupe α' , a été d'autant plus nuisible que les doses ajoutées ont été plus grandes. Il est toujours bien entendu qu'il n'est pas nécessaire, pour constater l'effet nuisible de l'acide, que l'on se trouve en présence d'acide libre.

L'expérience nous enseigne que, pour la cochenille et dans les conditions où nous opérons, l'optimum est situé au delà de la neutralité à la phthaléine et qu'il correspond à 5/12 de gouttes de soude $\frac{\text{N}}{10}$, ce qui fait

0 mgr. 03 en sus de la neutralité. Avec 10/12 de gouttes de $\text{NeOH} \frac{\text{N}}{10}$ (c'est-à-dire en présence de 0 mgr. 06 de soude libre) la décoloration est très lente, mais elle est encore beaucoup plus rapide qu'à la neutralité à l'hélianthine.

Pour l'hématéine ou l'hématoxyline, l'optimum correspond à la réaction naturelle du milieu.

Le gaïacol n'est pas sensible à ces influences (dans les réactions comprises entre celle du milieu naturel et la neutralité à l'hélianthine) mais il est très sensible à l'influence des phosphates. Les phosphates acides favorisent l'oxydation et les diphosphates la retardent. C'est le contraire qui a lieu pour l'alizarine sulfoconjuguée la cochenille, l'orcine, et certaines matières colorantes des fleurs. Nous voyons par ces exemples (en admettant qu'il n'entre en jeu dans ces réactions qu'une diastase unique) que les divers composés examinés sont plus sensibles à la réaction du milieu que l'oxydase elle-même.

Enfin d'autres expériences basées sur la coloration plus ou moins rapide de l'orcine en présence d'une quantité constante d'oxydase et sous l'influence de doses croissantes d'alcali nous ont conduit à constater encore ici l'effet éminemment favorable d'un milieu faiblement alcalin.

Comme, d'autre part, nous avons répété ces expériences en mesurant le volume d'oxygène absorbé, nous avons pu nous rendre compte qu'il existe une concordance assez étroite entre les deux modes d'appréciation.

CHAPITRE IX

DE L'INFLUENCE DES PHOSPHATES, DES CITRATES ET DES SELS DE MANGANÈSE DANS LES OXYDATIONS PROVOQUÉES PAR LE SUC DE *RUSSULA DELICA*.

L'étude que j'ai faite de ces sels dans un chapitre précédent m'a suggéré l'idée de les employer dans de nouvelles expériences sur les oxydases naturelles. Nous verrons plus loin quelles sont les conclusions que l'on peut tirer de cette étude comparative.

Examinons d'abord quel est l'effet DE PETITES DOSES DE PHOSPHATES NEUTRES OU ACIDES sur l'oxydation de l'alizarine sulfoconjuguée. Nous avons vu tout à l'heure que la réaction optima dans le cas de l'oxydation de l'alizarine par l'extrait de Russule correspond à la neutralité à la phtaléine. Cette neutralité est due à la transformation par NaOH des sels acides inactifs en sels neutres accélérants. Or, les phosphates acides se comportent vis-à-vis du milieu actif comme les sels acides de la macération, c'est-à-dire qu'ils sont inactifs et les phosphates bibasiques se comportent comme les sels de la macération qui sont alcalins à l'hélianthine, c'est-à-dire qu'ils sont activants. Pour s'en rendre compte, il suffit d'observer ce qui se passe lorsqu'on ajoute à une solution d'alizarine sulfoconjuguée quelques gouttes d'extrait de Russule. La réaction s'arrête au bout de très peu de temps; on pourrait même croire qu'elle n'a pas commencé si on n'avait eu la précaution de répéter la même expérience avec un tube

témoin ne contenant qu'une solution très étendue de matière colorante.

En effet, la décoloration de cette solution témoin indique bien qu'il y a eu oxydation au début dans l'autre essai, mais qu'elle est restée stationnaire. Divisons maintenant la solution colorée plus concentrée en trois portions égales, 1, 2, 3. La portion 1 sert de témoin, la portion 2 reçoit un excès de phosphate disodique et la portion 3 la même quantité de phosphate disodique et, en plus, une dose équivalente de phosphate acide. On constate alors au bout d'un certain temps que les tubes 2 et 3 se décolorent peu à peu et en même temps. Si on prélève de temps en temps de petites portions des tubes 1, 2, 3, on constate après addition d'un excès de soude que le numéro 1 se colore toujours d'une façon aussi intense, tandis que les portions 2 et 3 se colorent de moins en moins. Il arrive un moment où les portions 2 et 3 ne se colorent plus. L'oxydation est donc terminée et, fait remarquable, elle s'est achevée en même temps dans les deux tubes. Le liquide coloré du tube 1 en est toujours au même point. Il faut conclure de là que : 1° en l'absence de phosphates, l'oxydation s'arrête dès le début ; 2° que les phosphates bibasiques la favorisent ; 3° que les phosphates acides, sans favoriser l'oxydation, ne gênent nullement l'action des diphosphates.

Expériences basées sur la vitesse de décoloration par la diastase oxydante des solutions colorées. — Existe-t-il une dose optima de phosphate bibasique ? L'expérience démontre que, au delà d'une certaine dose, toute nouvelle addition de ce sel reste sans effet et qu'il n'y a pas de différence sensible dans la marche de l'oxydation, soit que l'on opère avec de très petites quantités, soit avec des quantités relativement fortes de phosphate. Mais ceci n'est vrai qu'autant que la réaction du milieu ne change pas. L'enzyme n'agit donc pour accomplir son œuvre qu'avec la dose de coenzyme qui lui est strictement nécessaire ; ce n'est que lorsque le phosphate disodique a été décomposé par les produits de la réaction que l'action s'arrête, mais alors une addition nouvelle de diphosphate provoque la reprise du phénomène d'oxydation.

Pour établir ces faits, il faut opérer avec des solutions très diluées de matière colorante. On peut alors suivre les différentes phases du phéno-

mène. La rapidité de la réaction se mesure par la vitesse de la décoloration. Celle-ci se contrôle par l'addition d'un excès d'alcali qui indique, par suite de la recoloration partielle ou de l'absence de coloration, une phase ou la fin de la réaction.

On étend de 9 fois son volume d'eau une solution saturée de matière colorante et l'on verse dans le tube n° 1 *33 gouttes* d'eau ; dans le tube n° 2, *33 gouttes d'eau + 0 mgr. 1* de phosphate bibasique ; dans le tube n° 3, on verse *33 gouttes d'eau + 1 mgr.* de phosphate secondaire dans le tube n° 4, on verse *33 gouttes d'eau + 3 mgr.* de phosphate bibasique. Puis :

Dans le tube 1 on ajoute 5 gouttes de sol. col.

+ 1 goutte de mac. neut. à la phtaléine.

Dans le tube 2 on ajoute 5 gouttes de sol. col.

+ 1 goutte de mac. neut. à la phtaléine.

Dans le tube 3 on ajoute 5 gouttes de sol. col.

+ 1 goutte de mac. neut. à la phtaléine.

Dans le tube 4 on ajoute 5 gouttes de sol. col.

+ 1 goutte de mac. neut. à la phtaléine.

Après *3 ou 4 minutes*, on prélève un volume égal du liquide de chaque tube et on ajoute à chaque prise d'essai un excès d'alcali. On constate alors que la réaction n'est pas tout à fait terminée dans 1, qu'elle est complètement terminée dans 2 et 3 et pas complètement dans 4. Au bout de 10 minutes la réaction est terminée dans tous les tubes.

Si l'on répète la même expérience avec *10 gouttes* de solution colorée au lieu de 5, voici ce que l'on observe au bout de 5 minutes : 1 se colore beaucoup. 2, 3 et 4 se colorent moins et la teinte est sensiblement la même. Au bout de 10 minutes, on observe ceci : 1 se colore fortement ; 2 très faiblement ; 3 plus du tout ; 4 comme 2. Si l'on examine les mêmes liqueurs au bout d'une demi-heure, le n° 1 se colore encore par addition de soude, mais aucun des autres.

D'après ce que nous venons de voir, l'optimum correspond au n° 3 avec 1 mgr. de phosphate.

Voici enfin une expérience qui démontre que, vis-à-vis du sulfoconjugué d'alizarine, les sels de la macération de Russule se comportent comme un mélange de phosphates acides et de phosphates neutres.

On verse 5 gouttes d'une solution colorée, préparée comme plus haut, dans chacun des tubes d'une série de 5 tubes ; on complète à 1 cc. avec de l'eau distillée. Dans le tube 1 on ajoute 1 goutte d'une solution de diphosphate, qui représente une quantité de sel équivalente à la moitié de ce que 2 gouttes de macération normale sont présumées contenir en se fondant sur son alcalinité initiale à l'hélianthine ; puis on amène à 2 cc.

Dans le tube n° 2, on ajoute une quantité de phosphate bibasique égale à ce que 2 gouttes de macération sont présumées contenir ; puis on complète à 2 cc. On amène les tubes 3 et 4 au même volume avec de l'eau distillée. Ensuite on ajoute dans chacun des tubes 1, 2, 3, *deux gouttes* de

macération neutralisée vis-à-vis de l'hélianthine et dans le tube 4 on verse 2 gouttes de macération normale. Au bout de 10 minutes, on prélève des portions égales de liquide dans les 4 tubes et on ajoute un excès d'alcali. On constate alors que le n° 3 se colore d'une façon aussi intense *qu'un témoin qui n'a pas reçu de macération*, que le n° 1 est coloré d'une façon beaucoup moins intense que le n° 3 et que les n°s 2 et 4 sont à peine teintés.

Des expériences analogues faites avec les citrates montrent que les citrates neutres tribasiques se comportent sensiblement comme les phosphates bibasiques, mais que les citrates acides exercent sur la réaction oxydante une action paralysante alors que les phosphates acides sont indifférents.

Les sels de manganèse ont une action retardatrice très marquée qui paraît être due à la formation d'une laque. Si l'on se rappelle que la lac-case de l'arbre à laque, qui doit en grande partie son activité au manganèse, n'oxyde pas les composés solubles de l'alizarine (tels que alizarine sulfuconjuguée et alizarinate de sodium), on est amené à conclure que dans le cas particulier qui nous occupe, ce n'est pas le manganèse qui joue le rôle de coenzyme ou que tout au moins son action est insuffisante.

Les phosphates et les citrates se comportent envers la cochenille et l'or-cine comme envers l'alizarine. Les sels de manganèse se montrent en général indifférents.

Contrôle des expériences précédentes par la mesure du volume d'oxygène absorbé

J'ai cru nécessaire de compléter ces expériences par quelques mesures plus précises sur le volume d'oxygène absorbé. Les chiffres que j'ai obtenus ainsi, en confirmant mes résultats antérieurs, permettent de leur donner une base plus solide.

Nous avons vu dans ce qui précède (expériences de vitesse, c'est-à-dire par décoloration) qu'une faible dose d'alcali libre ou d'un sel de manganèse retarde considérablement l'oxydation de l'alizarine. *Dans les expériences de durée* (6 heures ou 24 heures), il apparaît que, même sous l'influence d'un petit excès d'alcali libre, et malgré le retard qui se manifeste au début de l'oxydation, celle-ci peut être poussée très loin. Nous verrons aussi comment, dans quelques cas particuliers, l'acétate de manganèse peut exercer une faible action favorisante lorsqu'on prolonge les expériences.

Voici d'abord quelques expériences qui démontrent l'influence considérable que peuvent avoir les phosphates et les citrates dans les phénomènes oxydasiques.

Durée des expériences : 24 heures.

Alizarine sulfoconjuguée	Volume total du liquide	Macération	Phosphate ajouté	Oxyg. absorbé
0 gr. 25	29 cc.	1 cc.	0	Traces
0 gr. 25	29	0	3 cc. (84 mgr.)	»
0 gr. 25	29	1	1 (28 mgr.)	2 cc. 5
0 gr. 25	29	1	3 (84 mgr.)	7 cc. 5

Influence des phosphates et des citrates sur l'oxydation de l'orcine

Durée de l'expérience : 24 heures.

Orcine	Volume total du liquide	Macération	Phosphate	Citrates	Oxygène absorbé	
					—	Corrigé
0 gr. 7	25 cc.	0	0	0	1 cc. 5	0
0 gr. 7	25	0	2 cc. (56 mgr.)	0	1 cc. 8	0 cc. 3
0 gr. 7	25	1 cc.	0	0	7 cc. 8	6 cc. 3
0 gr. 7	25	1	1 cc. (28 mgr.)	0	12 cc. 6	11 cc. 1
0 gr. 7	25	1	2 cc. (56 mgr.)	0	14 cc.	12 cc. 5
0 gr. 7	25	1	0	1 cc.	10 cc. 6	9 cc. 1
0 gr. 7	25	1	0	0	4 cc 7	3 cc 2

Neutralisé
vis-à-vis de
l'hélianthine

Nous voyons ici que grâce au phosphate l'absorption d'oxygène peut doubler et qu'une dose double de ce sel n'augmente guère l'absorption. Le citrate est un peu moins actif que le phosphate. Il apparaît, d'autre part, que la macération qui a été neutralisée vis-à-vis de l'hélianthine par addition d'acide, et qui par conséquent ne contient plus de sels alcalins vis-à-vis de ce réactif, a perdu une grande partie de son activité.

Dans l'expérience qui va suivre, on peut étudier l'action comparée de doses équimoléculaires de phosphate disodique de citrate trisodique et d'acétate manganeux vis-à-vis de l'alizarine sulfoconjuguée.

Durée de l'expérience : 24 heures.

Alizarine	Volume total du liquide	Macération	Phosphate	Citrate	Acétate	Oxygène absorbé	
gr.	cc.	cc.	cc.	cc.	cc.	cc.	Corrigé cc.
0,25	30	0	0	0	0	1,2	
0,25	30	1	3	0	0	7	5,8
0,25	30	1	0	3	0	7	5,8
0,25	30	1	0	0	3	3,7	2,5

Les deux premiers sels se comportent ici d'une façon identique.

L'acétate de manganèse se montre beaucoup moins actif.

Lorsqu'on mesure les volumes d'oxygène au bout de 6 heures, on observe ceci :

Alizarine	Volume total du liquide	Macération	Phosphate	Acét. Mn.	Oxygène absorbé	
gr.	cc.	cc.	cc.	cc.	cc.	cc.
0,25	30	0	0	0	0,2	0
0,25	30	1	0	0	0,5	0,3
0,25	30	1	3	0	3,7	3,5
0,25	30	1	0	3	1	0,8

Donc au bout de 6 heures, alors qu'en présence de phosphate, l'oxygène absorbé est notable, l'acétate de manganèse n'a presque pas d'action. L'action retardatrice des sels de manganèse, de même que celle d'alcali libre, n'est sensible que dans les phases initiales de la réaction, ainsi que nous l'avons constaté ailleurs. Si l'on compare l'action d'une faible dose d'alcali libre à celle des phosphates bibasiques, on constate après 24 heures des effets identiques. Donc, malgré la lenteur excessive de la réaction sous l'influence de la soude comme nous l'avons établi par ailleurs, cette réaction finit par rattraper l'autre qui est très vive au début, mais qui se ralentit de plus en plus.

Alizarine	Volume total du liquide	Macération	Phosphate disodique	NaOH	Oxygène absorbé	
gr.	cc.	cc.	cc.	mgr.	cc.	cc.
0,25	30	0	0	0	1	0
0,25	30	1	3	0	6,5	5,5
0,25	30	1	0	12	7	6

Comme nous l'avons fait plus haut avec l'alizarine, étudions sur l'orcine l'action des trois sels.

Orcine	Volume total du liquide	Macération	Phosphate	Citrate	Ac. Mn.	Oxygène absorbé	
gr.	cc.	cc.	cc.	cc.	cc.	cc.	Corrigé
0,7	25	0	0	0	0	2,7	cc.
0,7	25	1	0	0	0	9,9	7,2
0,7	25	1	1	0	0	13,4	10,7
0,7	25	1	0	1	0	11,6	8,9
0,7	25	1	0	0	1	10,2	7,5

On constate ici une activation notable par le phosphate disodique et le citrate trisodique, tandis que l'acétate manganoux n'a aucun effet excitant. Il va sans dire que les mêmes expériences ont été répétées avec les trois sels, mais sans macération et, dans ce cas, on n'observe pas d'absorption sensible d'oxygène.

Enfin, je citerai encore une expérience où j'ai étudié comparativement l'influence de la réaction produite par la neutralisation de l'extrait, 1^o vis-à-vis de la phtaléine; 2^o vis-à-vis de l'hélianthine. J'ai étudié en outre l'influence de la réaction que l'on obtient lorsqu'à la macération neutralisée vis-à-vis de l'hélianthine on ajoute : 1^o la moitié de la dose de phosphate bibasique que la macération naturelle neutralisée à la phtaléine est présumée contenir, en se fondant sur son alcalinité à l'hélianthine; 2^o la totalité de cette dose de phosphate; 3^o la totalité de la même dose de phosphate et, en plus, une dose équivalente de phosphate acide.

La durée de cette expérience est de 24 heures.

Le volume total du liquide est de 25 centimètres cubes.

Orcine	Macér.	NaOH $\frac{N}{10}$	SO ³ H ² $\frac{N}{10}$	PO ⁴ Na ² H Cristallisé	PO ⁴ NaH ² Anhydre	Oxygène absorbé	
gr.	cc.	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.	cc.	cc.
0,8	0	0	0	0	0	1,5	Corrigé
0,8	1	0,6 (1)	0	0	0	10	8,5
0,8	1	0	3 (2)	0	0	4,7	3,2
0,8	1	0	3 (2)	13,16	0	7	5,5
0,8	1	0	3 (2)	26,32	0	9,8	8,3
0,8	1	0	3 (2)	26,32	8,57	9,9	8,4
0,8	1	0,6 (1)	0	52,6	0	14,5	13

Ces résultats sont en concordance parfaite avec nos observations antérieures (Essais par décoloration). Nous les résumerons plus tard dans nos conclusions.

Avant de terminer ce chapitre, citons encore une expérience analogue d'une durée de 6 heures seulement et dans

1. Neutre à la phtaléine.
2. Neutre à l'hélianthine,

laquelle nous avons en outre examiné l'influence de la macération *bouillie*.

Le volume total du liquide est de 25 cc.

Orcine	Macér.	$\text{SO}_4\text{H}^2 \frac{\text{N}}{10}$	$\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$	PO_4NaH^2	Mac. bouillie	Oxygène absorbé
gr.	cc.	mgr.	mgr.	mgr.	cc.	cc.
0,8	0	0	0	0	0	0,7
0,8	1	0	0	0	0	5,3
0,8	1	3	0	0	0	3,1
0,8	1	3	0	8,57	0	3,5
0,8	1	3	26,3	0	0	5,7
0,8	1	0	52,6	0	0	8,5
0,8	1	0	0	0	2	5,5

Ces chiffres viennent confirmer les résultats de l'expérience précédente et nous font voir en outre que les propriétés excitantes des sels contenus dans la macération ont été détruites par l'ébullition prolongée que nous lui avons fait subir.

Restait la question de savoir si les sels contenus dans la macération et qui réagissent comme un mélange de phosphates acide et bibasique sont en réalité des phosphates (Le dosage de l'acide phosphorique total dans l'extrait glyciné devait nous renseigner à cet égard). En prenant pour base de notre appréciation la mesure de l'alcalinité de cet extrait vis-à-vis de l'hélianthine, nous aurions dû trouver dans 10 cc. de celui-ci 50 mgr. en P^2O^5 ; or, le dosage ne nous donne que 5 mgr. 7 d'acide phosphorique anhydre par 10 cc. Il est donc évident que les sels de la macération qui réagissent comme des phosphates ont une composition différente de ceux-ci.

CHAPITRE X

SUR LA SPÉCIFICITÉ DES OXYDASES

Avant de clore mon étude consacrée aux phénomènes oxydasiques naturels, il m'a paru intéressant de reprendre une question restée en suspens au cours de cet examen.

Nous avons déjà vu que le suc de *Russula delica* peut produire des oxydations que l'on n'obtient pas à l'aide de la laccase de l'arbre à laque. J'ai montré aussi que ces oxydations peuvent être produites par l'extrait de Russule chauffé un quart d'heure à 65-70° ; ce qui exclut l'intervention de la tyrosinase. Il y avait donc de fortes présomptions en faveur de l'existence d'une diastase spécifique. Je rappelle que le suc de Russule oxyde l'orcine avec une grande facilité et qu'une réaction faiblement alcaline est éminemment favorable à cette oxydation. Ainsi lorsque sur 0 gr. 7 d'orcine en solution dans 25 cc. d'eau on fait agir 1 cc. d'une solution glycérinée de Russule déjà ancienne, on obtient au bout de 24 heures une absorption d'oxygène égale à 6 cc., qui s'élève à 12 cc. 5 si, à une liqueur semblable, on ajoute 2 cc. d'une solution de phosphate disodique (2 gr. 8 de sel crist. o/o). Si, d'autre part, on fait réagir pendant 48 heures, sur la même quantité d'orcine, 1 cc. d'une solution de laccase de l'arbre à laque, on n'observe aucune absorption d'oxygène, alors qu'avec 0 gr. 7 d'hydroquinone et 0 cc. 5 seulement de la même solution de laccase, l'absorption d'oxygène atteint 15 cc.

Dans une autre expérience où j'ai oxydé l'hydroquinone à l'aide de la macération de Russule, voici quels ont été les résultats après 20 heures de contact.

Hydroquinone	Vol. total de liq.	Extrait	PO ⁴ Na ₂ H	Oxygène absorbé
0 gr. 7	25 cc.	0 cc. 0	1 cc.	4 cc. 4
0 gr. 7	25 cc.	0 cc. 5	0 cc.	9 cc. 7
0 gr. 7	25 cc.	0 cc. 5	1 cc.	9 cc.

Il est très curieux de constater que le phosphate disodique qui provoque ici à lui tout seul une absorption notable d'oxygène est sans aucun secours dans l'oxydation de l'hydroquinone par l'extrait de Russule. C'est précisément le phénomène inverse qui a lieu dans l'oxydation de l'orcine par le même extrait en présence de phosphate ou par le phosphate agissant seul (1). D'autres expériences nous ont montré que si l'on fait varier la réaction du milieu, soit par addition de traces d'acide sulfurique, soit par addition de faibles doses de soude, la quantité d'oxygène absorbé au bout de 24 heures est la même pour l'hydroquinone, tandis que pour l'orcine elle peut varier du simple au quadruple dans les mêmes conditions. Ces caractères semblent donc différencier nettement la laccase de l'oxydase nouvelle, à laquelle on pourrait donner le nom *d'orcinease* pour se conformer aux règles de la nomenclature adoptée.

Si je borne là mon examen, la spécificité du suc de Russule vis-à-vis de l'orcine m'apparaît comme un phénomène très simple, mais si je pousse mes recherches plus loin la question se complique singulièrement. Ainsi, la résorcine, qui ne s'oxyde pas par la laccase de l'arbre à laque, comme nous l'ont appris déjà les expériences de G. BERTRAND, peut au contraire s'oxyder par le suc de Russule, mais plus difficilement que l'orcine. L'addition de phosphate disodique à la

1. Ici le phosphate seul n'a pas d'action sensible, tandis que si on l'ajoute à l'extrait, il double le pouvoir absorbant de celui-ci.

résorcine produit, comme pour l'orcine, une absorption plus forte d'oxygène ; mais cette action accélératrice ne se produit pas avec la même intensité, comme en fait foi l'expérience suivante.

0 gr. 7 résorcine dans 25 cc. d'eau + 1 cc. macération	O. absorbé.	Coloration
Sans addition de $\overline{\text{PO}^4\text{Na}^2\text{H}}$	3 cc. 2	Jaune.
Avec addition de 1 cc. $\text{PO}^4\text{Na}^2\text{H}$. .	4 cc. 7	Intense.
Avec addition de 3 cc. $\text{PO}^4\text{Na}^2\text{H}$. .	6 cc. 1	Tr. intense.

Des témoins sans macération n'accusent qu'une absorption d'oxygène insignifiante par le phosphate. Nous voyons par ces chiffres que nous sommes loin des absorptions signalées plus haut pour l'orcine. L'alizarine sulfoconjuguée, ainsi que nous l'avons déjà constaté au cours de cette étude, ne s'oxyde que très faiblement sous l'influence de l'oxydase seule. La même substance ne s'oxyde pas non plus d'une façon sensible sous l'influence d'un diphosphate alcalin. Pour observer une oxydation énergique de la matière colorante, il faut réunir les deux facteurs : l'enzyme et le sel qui, lorsqu'ils agissent séparément sont presque inactifs. L'alizarine sulfoconjuguée s'oxyde donc encore plus difficilement que la résorcine. Il semble résulter de cet examen méthodique qu'à mesure que la résistance du substratum à l'oxydation s'accroît, l'intervention d'un plus grand nombre de facteurs devienne nécessaire. Si donc nous classons les quatre substances que nous venons d'examiner par ordre de leur sensibilité à l'oxydation par l'extrait de Russule nous placerons au

Premier rang : *l'hydroquinone* ;

Deuxième rang : *l'orcine* ;

Troisième rang : *la résorcine* ;

Quatrième rang : *l'alizarine sulfoconjuguée*.

Une nouvelle preuve que ces diverses substances offrent une résistance plus ou moins grande à l'oxydation dans l'ordre que nous venons d'indiquer, c'est la facilité avec laquelle l'hydroquinone s'oxyde par le phosphate disodique

alors que l'orcine, la résorcine et l'alizarine s'oxydent à peine sous l'influence de ce sel employé seul. Les alcalis agissent d'ailleurs dans le même sens.

Enfin nous avons déjà vu qu'en faisant réagir 1 cc. d'une solution de laccase de l'arbre à laque sur 0 gr. 7 d'orcine, on n'observe aucune absorption d'oxygène. Si nous répétons la même expérience en modifiant le milieu par l'addition de 1 cc. de phosphate disodique, il se produit une coloration intense de l'orcine accompagnée d'une absorption de 2 cc. 5 d'oxygène. Cette simple addition a fait apparaître une nouvelle spécificité.

Nous pouvons donc conclure des faits rapportés ci-dessus que :

1^o Il faut donner une interprétation beaucoup plus large à la notion de spécificité.

2^o La spécificité peut résulter, comme le montrent les expériences précédentes, soit de la présence d'une diastase particulière, ainsi qu'on l'admet habituellement ; soit de la superposition d'un certain nombre de facteurs qui, par leur action combinée, facilitent l'oxydation.

Résumé des faits principaux mis en lumière dans la troisième partie

Il me paraît nécessaire de dégager de l'ensemble des observations faites au cours de cette étude celles qui semblent présenter un intérêt particulier. Je vais essayer de les résumer en quelques lignes.

1^o De petites quantités de phosphates bibasiques activent considérablement l'oxydation par le suc de Russule, de l'orcine, de la résorcine, de l'alizarine sulfoconjuguée, de la cochenille ; de faibles doses d'alcali libre retardent la réaction, mais celle-ci se poursuit quand même avec lenteur.

2^o Les phosphates acides sont indifférents et ils ne gênent

pas l'action activante des phosphates bibasiques dans la limite de mes expériences et pour les réactions mentionnées ci-dessus.

3° La transformation des sels neutres de la macération glycérinée de *Russule* en sels acides ou acides organiques (neutres à l'hélianthine) (1) (59) paralyse l'oxydation de l'orcine, de la cochenille et de l'alizarine sulfoconjuguée (Le gaïacol et l'hydroquinone sont à peine sensibles à cette influence).

4° La macération modifiée comme ci-dessus reprend son activité première si on lui restitue une quantité de phosphate bibasique équivalente à celle qu'elle était présumée contenir au début, en se fondant sur son alcalinité initiale à l'hélianthine.

5° Pour une quantité déterminée d'enzyme, il existe une dose optima de phosphate au-dessus de laquelle toute nouvelle addition reste sans effet et peut même devenir nuisible.

6° Dans le cas de l'alizarine sulfoconjuguée, la réaction du milieu se modifiant à mesure que l'oxydation progresse, arrête celle-ci, peu après son début, mais la réaction reprend vivement dès qu'on ajoute un phosphate bibasique.

7° Les sels organiques d'une macération glycérinée ancienne se comportent dans leurs propriétés essentielles comme un mélange de phosphates acides et de phosphates bibasiques où ces derniers domineraient. L'ébullition de la macération glycérinée fait disparaître ces caractères et le dosage de l'acide phosphorique montre que ces sels activants ne sont pas des phosphates minéraux.

8° Les citrates tribasiques sont un peu moins activants que les phosphates bibasiques, mais les citrates acides exercent sur la réaction une action paralysante, ce qui les distingue des phosphates monobasiques indifférents.

9° Les sels de manganèse se montrent peu actifs ou indiffé-

1. Cette réaction correspond à celle des acides indifférents vis-à-vis de la laccase (G. BERTRAND) (59) et aussi à celle des phosphates acides également indifférents, d'après mes propres observations.

rents dans les réactions nouvelles que nous avons étudiées à l'aide de la macération de Russule.

10° Il faut donner une interprétation beaucoup plus large à la notion de spécificité, tout au moins lorsqu'il s'agit d'enzymes oxydants.

11° La spécificité peut résulter, soit de la présence d'une diastase particulière, ainsi qu'on l'admet habituellement, soit de la superposition d'un certain nombre de facteurs qui, par leur action combinée, facilitent l'oxydation par le même enzyme de substratums difficilement oxydables.

Bien que les observations qui vont suivre sortent un peu des limites que je me suis imposées, j'estime qu'elles sont suffisamment importantes pour trouver leur place ici.

Il y a lieu de distinguer trois catégories de substances au point de vue de leur oxydabilité par le suc de Russule :

1° Celles qui exigent un milieu alcalin, dont la réaction type est fournie par le phosphate disodique : Exemple : *l'alizarine sulfoconjuguée*.

2° Celles (dont il n'a été que peu question ici) qui exigent un milieu faiblement acide, dont la réaction type est fournie par le phosphate monosodique. Exemple : *l'hélianthine* (1).

3° Celles qui sont moins sensibles aux faibles changements de réaction et qui peuvent s'oxyder plus ou moins rapidement en milieu faiblement alcalin ou faiblement acide, du type phosphate alcalin ou phosphate acide. Exemple : *l'hydroquinone*, le *gaiacol*.

(Les sels en question doivent toujours être employés à de faibles concentrations).

1. Il n'est pas inutile de faire remarquer que cette matière colorante ne contient pas de groupement phénolique.

QUATRIÈME PARTIE

1° ANALOGIES ENTRE LES OXYDASES NATURELLES ET ARTIFICIELLES ;

2° OBSERVATIONS SUR LA SPÉCIFICITÉ DANS LES PHÉNOMÈNES OXYDASIQUES ;

3° IDÉES NOUVELLES QUE CES OBSERVATIONS SUGGÈRENT RELATIVEMENT AU FONCTIONNEMENT DES DIASTASES ;

4° CONCLUSION.

Si nous rapprochons maintenant les principaux faits mis en lumière dans la deuxième et la troisième partie de ce travail, nous voyons ceci :

Qu'il s'agisse de phénomènes diastasiques artificiels ou naturels, l'intervention des mêmes sels peut donner lieu à des manifestations identiques. Ces sels, ainsi que nous l'avons établi au cours de cette étude, sont facilement hydrolysables, ont un caractère faiblement alcalin et sont déjà capables de fixer par eux-mêmes l'oxygène atmosphérique sur quelques polyphénols. Leur rôle ne consiste pas seulement à maintenir une certaine alcalinité dans le milieu actif, mais à remplir en même temps l'office de véritables coenzymes, en activant l'oxydase naturelle ou artificielle (1). La preuve de ce que j'avance ici nous est fournie par l'examen comparé de quelques phénomènes oxydasiques artificiels et naturels.

Afin de faire mieux ressortir les analogies qui existent

1. On conçoit très bien dès lors pourquoi des doses infimes d'acides minéraux ont pour effet de retarder ou de paralyser l'action des oxydases. En effet, ces acides neutralisent une partie ou la totalité des sels alcalins qui entrent dans la composition du mélange complexe qui constitue l'oxydase.

entre ces deux catégories de phénomènes, nous mettrons en parallèle des expériences faites, d'une part, avec les oxydases artificielles et, d'autre part, avec l'extrait de Russule. Nous ne nous étendrons pas sur la description du mode opératoire que nous avons déjà indiqué antérieurement.

Dans les séries A et B, nous avons employé l'hydroquinone et la pyrocatechine pour étudier les oxydases artificielles et dans la série C nous avons eu recours à l'orcine pour étudier l'oxydase naturelle. Les chiffres que nous citons représentent les résultats moyens d'un certain nombre d'expériences.

Phénomènes oxydasiques artificiels

Série A (1 gr. hydroquinone)

O. absorbé	O. absorbé	O. absorbé
0 mgr. 02 Fe	0 cc.	0 mgr. 02 Fe
2 cc. $(C^2H^3O^2)^2Mn$	5 cc.	2 cc. PO^4Na^2H
Fe + $(C^2H^3O^2)^2Mn$	7 cc.	Fe + PO^4Na^2H
		0 mgr. 5 Mn
		2 cc. $C^6H^5O^7Na^3$
		Mn + $C^6H^5O^7Na^3$
		0 cc.
		3 cc.
		3 cc.
		6 cc.

Série B (1 gr. pyrocatechine)

O. absorbé	O. absorbé	O. absorbé
0 mgr. 02 Fe	0 cc.	0 mgr. 02 Fe
4 cc. $(C^2H^3O^2)^2Mn$	3 cc. 5	4 cc. PO^4Na^2H
Fe + $(C^2H^3O^2)^2Mn$	6 cc.	Fe + PO^4Na^2H
		0 mgr. 02 Fe
		4 cc. $C^6H^5O^7Na^3$
		Fe + $C^6H^5O^7Na^3$
		0 cc.
		3 cc.
		6 cc.

Phénomènes oxydasiques naturels

Série C (0 gr. 7 orcine)

	O. absorbé
1 cc. macér. neutr. à l'héliant. p. add. de SO^4H^2	$\frac{N}{10}$ 3 cc. 2 incolore.
1 cc. macér. avec sa réaction naturelle	6 cc. 2 or. clair.
1 cc. macér. neut. à la pht. p. add. de NaOH	$\frac{N}{10}$ 8 cc. 5 orangé.
1 cc. macér. avec add. de 1 cc. PO^4Na^2H	11 cc. 1 col. int.
1 cc. macér. » » de 1 cc. $C^6H^5O^7Na^3$. . .	9 cc. 1 » »
1 cc. macér. » » de 1 cc. $(C^2H^3O^2)^2Mn$. . .	6 cc. 5 » »

Rappelons encore l'expérience déjà citée où l'on voit que vis-à-vis de l'alizarine le suc de Russule est pour ainsi dire inactif, si on ne lui adjoint pas un sel à base alcaline, comme, par exemple, le phosphate disodique.

Alizarine sulfoc.	Vol. tot. du liq.	Macerat.	Phosph. ajouté.	Oxy. absorbé
0,25	29 cc.	1 cc.	0 cc.	Traces
0,25	29 cc.	0 cc.	3 cc. (84 mgr.)	Traces
0,25	29 cc.	1 cc.	1 cc.	2 cc. 5
0,25	29 cc.	1 cc.	3 cc.	7 cc. 5

Nous voyons que l'orcine et l'alizarine sulfoconjuguée sont particulièrement sensibles à l'influence activante du milieu alcalin. Si, d'autre part, nous essayons d'oxyder l'orcine ou l'alizarine sulfoconjuguée à l'aide du ferrocyanure de fer ou du sulfate de manganèse associés à l'un des sels dont nous venons de constater l'influence activante sur l'hydroquinone et la pyrocatechine, nous n'arrivons à aucun résultat appréciable. Ces faits sont liés à des questions de spécificité, ainsi que je l'ai démontré à la fin du chapitre VI dans la II^e partie de cette étude à propos de l'oxydation de l'hydroquinone et de la pyrocatechine. Ils trouvent leur explication dans le fait de l'absence, dans le système artificiel, des substances spécifiques contenues dans l'extrait de Russule. Rappelons pour plus de précision que, lorsque nous avons combiné l'action du citrate trisodique avec celle de doses infimes de ferrocyanure de fer, inactives par elles-mêmes, nous avons rendu ce colloïde très actif vis-à-vis de la pyrocatechine, mais non vis-à-vis de l'hydroquinone, tandis que, en combinant l'action du même citrate avec celle de traces de sulfate manganoux, inactives par elles-mêmes, nous avons rendu ce dernier sel très actif vis-à-vis de l'hydroquinone, mais non vis-à-vis de la pyrocatechine. D'autre part, nous avons constaté (p. 53) que la formation de certains produits d'oxydation des phénols, tels que quinhedrone, purpurogalline, tétragaïaquinone, est sous la dépendance d'associations de sels bien déterminés, dont les uns ont pour effet de fixer l'oxygène atmosphérique

sur les phénols et les autres de renforcer cette action et de produire des oxydations d'un caractère spécifique bien marqué. Si nous rapprochons ce dernier mode d'action de phénomènes de superposition que nous avons signalés dans la III^e partie de cette thèse à propos de la spécificité des oxydases naturelles, nous constatons une similitude d'action singulière entre ces deux genres d'oxydation.

Nous voyons, en effet, dans le cas des oxydases artificielles, comme dans celui des oxydases naturelles, qu'il est parfois nécessaire de superposer plusieurs facteurs bien déterminés pour obtenir des actions spécifiques (1).

Tout en restant dans les limites d'une saine hypothèse, on est conduit par ces rapprochements à l'idée que certaines actions diastasiques peuvent résulter du concours simultané de plusieurs substances définies et que la spécificité du système due à l'un de ces composés pourrait être transformée en une spécificité nouvelle par l'introduction à la place de ce composé, d'une substance différente.

On peut aussi admettre dans un tel système la présence simultanée de plusieurs substances à fonction spécifique.

Si, d'autre part, l'on songe qu'un changement de réaction dans le sens de l'alcalinité ou de l'acidité peut faire naître des spécificités nouvelles ainsi que nous l'avons constaté avec le suc de Russule pour l'alizarine et l'hélianthine, on est conduit à se demander s'il faut admettre pour chacun de ces corps l'existence d'une diastase particulière ?

Aussi bien j'estime que s'il reste encore beaucoup d'enzymes spécifiques à découvrir, il y a lieu de soumettre à un examen plus approfondi certaines diastases classées dans telle ou telle catégorie. Un tel examen nous réserve peut-être des surprises.

Si malgré leur apparence séduisante, les idées que je viens

1. Ces phénomènes de spécificité, ayant été analysés d'une façon méthodique dans un mémoire publié récemment en collaboration avec M. de STOECKLIN (60) je n'ai pas à y insister ici.

d'exposer n'étaient qu'une simple vue de l'esprit, basée sur une expérimentation insuffisante, l'on voudra bien excuser ma hardiesse en tenant compte du grand nombre de faits nouveaux que j'ai observés et dont d'autres tireront peut-être un jour, à la lumière d'observations nouvelles, des conclusions plus conformes à la réalité.

Ce travail a été exécuté à l'Institut Pasteur dans les laboratoires du Service des Fermentations.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ROUX et YERSIN. — *Ann. de l'Institut Pasteur*, t. II, p. 689, 1891.
- (2) RÉAUMUR. — Sur la digestion des Oiseaux. *Mém. de l'Ac. des Sc.*, p. 266 et 461, 1752.
- (3) SPALLANZANI. — Recherches sur la digestion, Genève, 1783.
- (4) KIRCHHOF. — *J. Phys. et Chim.*, t. LXXIV, p. 199, 1812.
- (5) DUBRUNFAUT. — *Soc. d'Agriculture*, Paris, 1823.
- (6) PAYEN et PERSOZ. — *Ann. Chim. et Phys.*, t. LIII, p. 73, 1833.
- (7) E. DUCLAUX. — *Traité de microbiologie*, t. II, p. 9.
- (8) PAYEN. — *Ann. Chim. et Phys.*, t. LVI, p. 337, 1834.
- (9) LIEBIG et WÖHLER. — *Ann. de Pharm.*, t. XXII, p. 1, 1837.
- (10) BERTHELOT. — *C. R. Ac. des Sc.*, t. C, p. 980, 1860.
- (11) ED. BUCHNER. — *Berichte d. deut. chem. Gesellsch.*, t. XXX, p. 117, 1897.
- (12) CL. BERNARD. — *Leçons sur les phen. de la vie communs aux animaux et aux végétaux*, t. II, p. 500-501.
- (13) JAQUET. — *Soc. de biologie*, 1892, p. 55.
- (14) BATELLI et Mlle STERN. — *C. R. Soc. biologie*, 23 février, 15 et 19 mars 1907.
- (15) KIKOROKURO YOSHIDA. — *Journal of the chem. Society*, t. XLVIII, p. 472, 1883.
- (16) G. BERTRAND. — *Ann. de Chim. et de Phys.*, 7^e série, t. XII, 1897.
- (17) G. BERTRAND. — Sur l'intervention du manganèse dans les oxydations provoquées par la laccase. *Bull. de la Soc. ch.*, t. XVII, p. 578 et 619.
- (18) G. BERTRAND. — Sur le pouvoir oxydant des sels manganeux et sur la composition chimique de la laccase. *Bull. de la Soc. chim.*, t. XVII, p. 753.
- (19) G. BERTRAND. — *Bull. de la Soc. chim.*, t. XVII, p. 623, 1897.
- (20) JOB. — *C. R. Ac. des Sc.*, t. CXXXVI, p. 45.
- (21) JOB. — *C. R. Ac. des Sc.*, t. CXXXIV, p. 1092.
- (22) JOB. — *Ann. de Chim. et de Phys.*, 7^e série, t. XX, 1900.
- (23) FOUARD. — Sur l'action catalytique exercée par les sels alcalins et alcalino-terreux dans la fixation de l'oxygène de l'air par les solutions de polyphénols. *C. R. Ac. des Sc.*, t. CXLII, p. 796.

- (24) FOUARD. — Sur une réaction du type oxydasique présentée par les composés halogénés des terres rares. *C. R. Ac. des Sc.*, t. CXLII, p. 1163.
- (25) TRILLAT. — *Bull. de la Soc. chim. de Paris*, 2^e série, t. 31 p. 807, 1904.
- (26) SCHÖNBEIN. — *Bastler Verhandlungen*, 1855 à 1867, I, 229, II, 9, III, 697, V, 34.
- (27) JACOBSON. — *Zeitschr. f. physiolog. chem.*, t. VI, p. 340, 1891.
- (28) SPITZER. — *Pflügers. Arch.* 57, p. 615, 1897.
- (29) LÖW. — On catalase. *U. S. Dept. of Agriculture*, Washington, 1901. Rep. n° 68.
- (30) LINOSSIER. — Contribution à l'étude des ferments oxydants. *C. R. Soc. biologie*, V, p. 373.
- (31) CHODAT et BACH. — *Bull. Herbarier Boissier*, 1903, p. 76.
- (32) J. WOLFF. — Sur quelques peroxydiastases artificielles. Du rôle capital du fer dans leur action. *C. R. Ac. des Sc.*, t. CXLVI, p. 781, 1908.
- (33) J. WOLFF. — Contribution à l'étude des peroxydiastases artificielles. *C. R.*, t. CXLVI, p. 1217, 1908.
- (34) J. WOLFF. — Sur quelques phénomènes oxydasiques provoqués par le ferrocyanure de fer colloïdal. *C. R. Ac. des Sc.* t. CXLVII, p. 745, 1908.
- (35) J. WOLFF. — Sur quelques propriétés nouvelles des oxydases de *Russula delica*. *C. R. Ac. des Sc.*, t. CXLVIII, p. 500, 1909.
- (36) J. WOLFF. — Oxydases naturelles et oxydases artificielles. Nouvelles observations sur la similitude de leurs propriétés et sur le rôle des phosphates. *Annales de la Brasserie et de la Distillerie*, p. 186, 1909.
- (37) J. WOLFF. — Observations sur la spécificité dans les phénomènes oxydasiques. Idées nouvelles qu'elles suggèrent relativement au fonctionnement des diastases. *C. R. Soc. de biologie*, t. CLXVI, p. 842, 22 mai 1909.
- (38) ARTHUS. — La nature des Enzymes. *Thèse doct. Médecine*. Paris 1896.
- (39) A. FERNBACH et J. WOLFF. — Transformations catalytiques de l'empois d'amidon. *Annales de la Brasserie et de la Distillerie*, 1909, p. 241.
- (40) A. FERNBACH. — *C. R. Ac. des Sc*, t. 142, p. 285.
- (41) A. FERNBACH et J. WOLFF. — Etude sur la saccharification diastasique des empois de fécule. *C. R. de l'Ac. des Sc.*, t. CXLV, p. 261.
- (42) E. DE STÖCKLIN. — *Thèse* présentée à la faculté des sciences de l'Université de Genève, 22 juin 1907.
- (43) E. DE STÖCKLIN. — *Thèse* présentée à la faculté des sciences de l'Université de Genève, 22 juin 1907.
- (44) *Loc. cit.*, n° 28.
- (45) J. SARTHOU. — Du rôle que paraît jouer le fer dans la schinoxydase. *Journ. de Pharm. et de Chim.*, 15 juin 1900,
- (46) J. WOLFF et E. DE STÖCKLIN. — *C. R. Ac. des Sc.* du 26 juin 1908.
- (47) EULER et J. BOLIN. — *Zeitschr. f. physiol. ch.*, Bd. LVII, p. 80-98, septembre 1908.
- (48) KJELDAHL. — *Medd. f. Carlsberg Labor.*, 1879, p. 148.

- (49) A. FERNBACH. — Recherches sur la sucrase. *Ann. de l'Institut Pasteur*, 1889 et 1890.
A. FERNBACH. — Recherches sur la saccharification de l'amidon par l'amylase du malt. *Ann. Brasserie et Distill.*, 1899, p. 433.
A. FERNBACH et HUBERT. — *C. R. Ac. des Sc.*, t. CXXXI, p. 293.
- (50) L. MAQUENNE et EUG. ROUX. — *Ann. de Chim. et Phys.*, 8^e série, t. IX, p. 199.
- (51) G. BERTRAND. — Influence des acides sur l'action de la laccase. *C. R. Ac. des Sc.*, t. CXV, p. 340.
- (52) *Loc. cit.*, n^o 41.
- (53) J. WOLFF. — *C. R. Ac. des Sc.*, t. CXLIV, p. 190.
- (54) FERNBACH et WOLFF. — *C. R. Ac. des Sc.*, t. CXLV, 1907, p. 80.
- (55) HUERRE. — Sur la maltase du maïs. *C. R. Ac. des Sc.*, t. CXLVIII, p. 300.
- (56) HUERRE. — Sur les maltases du maïs. *C. R. Ac. des Sc.*, t. CXLVIII, p. 506.
- (57) HUERRE. — Sur la maltase du sarrazin. *C. R. Ac. des Sc.*, t. CXLVIII, p. 1526.
- (58) AGULHON. — Influence de l'acide borique sur les actions diastasiques. *C. R. Ac. des Sc.*, t. CXLVIII, p. 1340.
- (59) G. BERTRAND. — Influence paralysante exercée par certains acides, sur la laccase. *Ann. de l'Institut Pasteur*, t. XXI, p. 657.
- (60) J. WOLFF et E. DE STÖCKLIN. — *Ann. de l'Institut Pasteur*, t. XXIII, novembre 1909.

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION.	1

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE PREMIER

Généralités sur les diastases.	5
Leur découverte.	5
Les diastases oxydantes	6
Hypothèse de G. BERTRAND sur le mécanisme des actions diastasiques en général et oxydasiques en particulier	7
Influence des métaux et des sels dans les phénomènes oxydasiques.	8
Généralités sur les peroxydiastases	9
Théorie de CHODAT et BACH sur les ferments oxydants	11
Combinaisons organiques du fer qui peuvent jouer le rôle de peroxydiastases ou d'oxydases	13

CHAPITRE II

Sur divers phénomènes d'oxydation provoqués par les sels de fer.	14
Action du sulfate ferreux sur la teinture de gaïac	15
Propriété des ferrocyanures alcalins	16

CHAPITRE III

Action du ferrocyanure de fer colloïdal sur l'hydroquinone	18
Sur la composition du ferrocyanure de fer colloïdal et sa prépara- tion	20
Comparaison entre le mode d'action du ferrocyanure de fer et le fonctionnement des peroxydiastases par l'étude de la transforma- tion du pyrogallol en purpurogalline. Méthode employée pour le dosage de la purpurogalline	22

	Pages
Influence des acides et des sels sur la marche de la réaction . . .	26
Expériences de M. J. SARTHOU sur la schinoxydase du faux poivrier .	28
Observations de M. E. DE STÖCKLIN et de l'auteur au sujet de l'action spécifique de certaines combinaisons du fer	29
Notion nouvelle relative aux actions spécifiques	30

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE IV

Sur quelques phénomènes oxydasiques artificiels	33
Analogie entre le mode d'action des sels de manganèse et de quel- ques sels alcalins	35
Relations entre le degré d'hydrolyse des divers sels de manganèse et le pouvoir correspondant de fixation par ces sels de l'oxygène atmosphérique	36
Méthode rapide employée au cours de ces recherches pour la déter- mination du volume d'oxygène absorbé	38

CHAPITRE V

De l'influence comparée de divers sels dans la production des phé- nomènes oxydasiques artificiels	41
Influence des acides, de doses croissantes de sel sur l'absorption d'oxygène	44
Action du phosphate disodique sur le pyrogallol en présence et en l'absence de ferrocyanure de fer	46

CHAPITRE VI

Etude comparée des phosphates alcalins, des citrates alcalins et de l'acétate de manganèse	48
Sur l'hydrolyse de divers sels	49
Sur la spécificité du fer et du manganèse dans leur action combinée avec le citrate trisodique	52
Autres exemples d'actions spécifiques artificielles	53
Sur l'oxydation du gaïacol, par un système artificiel	54

TROISIÈME PARTIE

CHAPITRE VII

Sur quelques propriétés nouvelles des oxydases de <i>Russula delica</i> . Importance de la réaction du milieu	57
Expériences sur la cochenille	61

CHAPITRE VIII

	Pages
Expériences destinées à déterminer la réaction optima dans l'oxydation par le suc de Russule, de l'orcine et de diverses matières colorantes.	63

CHAPITRE IX

De l'influence des phosphates, des citrates et des sels de manganèse dans les oxydations provoquées par le suc de <i>Russula delica</i> . .	68
Contrôle des expériences précédentes par la mesure du volume d'oxygène absorbé	71
Influence des phosphates et des citrates sur l'oxydation de l'orcine et de l'alizarine par le suc de <i>Russula delica</i>	72

CHAPITRE X

Sur la spécificité des oxydases	76
Résumé des faits principaux contenus dans la troisième partie . .	79

QUATRIÈME PARTIE

CHAPITRE XI

Analogies entre les oxydases naturelles et artificielles	82
Observations sur la spécificité dans les phénomènes oxydasiques naturels et artificiels	84
Idées nouvelles que ces observations suggèrent relativement au fonctionnement des oxydases.	85
CONCLUSION	85

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Détermination du poids moléculaire du saccharose
et de l'hydroquinone par la cryoscopie.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 7 février 1910.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

PAUL APPELL.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Paris, le 7 février 1910.

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,

L. LIARD.

